

# Cited Reference 1

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-539802

(P2002-539802A)

(43) 公表日 平成14年11月26日 (2002.11.26)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup> C 12 N 15/09 C 12 Q 1/68	識別記号 ZNA	F I C 12 Q 1/68 C 12 N 15/00	テマコト <sup>*</sup> (参考) A 4 B 0 2 4 ZNA A 4 B 0 6 3
--	-------------	------------------------------------	--

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 96 頁)

(21) 出願番号	特願2000-606779(P2000-606779)
(86) (22) 出願日	平成12年3月17日 (2000.3.17)
(85) 翻訳文提出日	平成13年9月18日 (2001.9.18)
(86) 國際出願番号	PCT/DK00/00128
(87) 國際公開番号	WO00/56920
(87) 國際公開日	平成12年9月28日 (2000.9.28)
(31) 優先権主張番号	PA 1999 00384
(32) 優先日	平成11年3月18日 (1999.3.18)
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)

(71) 出願人	エクシコン エ/エス EXIQON A/S デンマーク、ヴェドベク ディーケー 2950、ビグストゥッペン 9 Bygstruppen 9, DK-2950 Vedbaek DENMARK
(72) 発明者	ジャン・スコウブ デンマーク国 エスペルグード ディー・ ケ-3060 ストクホルムベ 55
(74) 代理人	弁理士 佐伯 慶生 Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA04 CA09 DA02 DA05 EA04 HA19 4B063 QA13 QA19 QQ43 QR32 QR56 QR62 QS34 QX02

(54) 【発明の名称】 複合生物試料における核酸の単工程調製及び検出

### (57) 【要約】

【課題】 複合生物試料から核酸の遊離及び検出を同時に行う方法を提供する。

【解決手段】 本発明は、細胞溶解及び細胞性核酸の遊離を促進するためのグアニジンチオシアネートのような強力なカオトロピック剤の使用の組合せ、及び溶解中に遊離された特異的な核酸を核酸ハイブリッド形成によって検出するための新規型二環式核酸類縁体、ロック核酸 (LNA) の使用に関する。特に、捕捉用LNAオリゴの共有結合による付着に関する方法に関する。試料調製の新規の方法、例えばポリアデニル化mRNA種にも関する。本発明は更に、方法の試薬及び適用と同様に方法を実行するための試薬も扱う。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 標的の核酸を単離する方法であつて、  
a) 核酸を含有する試料を提供すること、  
b) 試料中に細胞性物質を溶解分離し、成分を溶かし、及び試料中に核酸を変性  
させるためにカオトロピック剤を含有する溶解緩衝液で試料を処理すること、  
c) 少なくとも1つの捕捉用LNAプローブに試料から遊離した核酸を接触する  
ことを含み、前記捕捉用プローブは標的核酸に実質的に相補的であること、  
を含有してなる方法。

【請求項2】 捕捉用LNAプローブがリガンドに共有結合で付着する請求  
項1に記載の方法。

【請求項3】 捕捉用LNAプローブが固体表面に共有結合で付着する請求  
項1に記載の方法。

【請求項4】 LNAプローブに共有結合で付着したリガンドが抗リガンド  
に結合し、前記抗リガンドが共有結合で固体表面に付着する請求項2に記載の方  
法。

【請求項5】 試料から遊離した核酸と固体表面に付着したLNAとの接触  
の後、余分な材料から固体表面を分離する請求項3又は4に記載の方法。

【請求項6】 余分な材料を取り除くために固体表面を緩衝液で洗浄する請  
求項5に記載の方法。

【請求項7】 捕捉用プローブが標的核酸に相補的である、前記請求項いづ  
れかに記載の方法。

【請求項8】 捕捉用プローブが4~50の間のヌクレオチドの長さである  
、前記請求項いづれかに記載の方法。

【請求項9】 捕捉用プローブが8~30の間のヌクレオチドの長さである  
、前記請求項いづれかに記載の方法。

【請求項10】 捕捉用プローブが8~20の間のヌクレオチドの長さであ  
る、前記請求項いづれかに記載の方法。

【請求項11】 捕捉用プローブが8~15の間のヌクレオチドの長さであ  
る、前記請求項いづれかに記載の方法。

【請求項12】 1つより多くの捕捉用LNAプローブが使用され、この捕捉用プローブが異なった標的核酸に対して又は同一核酸の異なった領域に対して向けられた異なるLNAオリゴマーから成る、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項13】 別々の捕捉用プローブが、固体表面における配列形式で点状配置される請求項12に記載の方法。

【請求項14】 配列が少なくとも10の捕捉用プローブを有する請求項13に記載の方法。

【請求項15】 配列が少なくとも100の捕捉用プローブを有する請求項13に記載の方法。

【請求項16】 配列が少なくとも1,000の捕捉用プローブを有する請求項13に記載の方法。

【請求項17】 配列が少なくとも10,000の捕捉用プローブを有する請求項13に記載の方法。

【請求項18】 核酸が細胞、組織試料又は組織抽出物を起源とする、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項19】 細胞が古生物、原核細胞、真核細胞起源である請求項18に記載の方法。

【請求項20】 試料が、血液、血清、血漿、網状赤血球、リンパ球、尿、骨髓組織、脳脊髄液、又は血液若しくはリンパ、筋肉生検、肝生検、腎生検、膀胱生検、骨生検、関節生検、皮膚生検、臍臓生検、腸管生検、胸腺生検、乳房生検、子宮生検、精巣生検、眼生検、又は脳生検から調製されたいかなる産物、溶解緩衝液中にてホモジネートされたものに由来する請求項18に記載の方法。

【請求項21】 捕捉用プローブが、生物の特定の種に特異的な1つ又はそれより多くの標的核酸に対するLNAオリゴマーから成る、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項22】 捕捉用プローブが、生物の特定の種、亜種又は株に特異的な1つ又はそれより多くの標的核酸に対するLNAオリゴマーから成る、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項23】 捕捉用プローブが、微生物の特定の種に特異的な1つ又はそれより多くの標的核酸に対するLNAオリゴマーから成る、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項24】 捕捉用プローブが、微生物の特定の種、亜種又は株に特異的な1つ又はそれより多くの標的核酸に対するLNAオリゴマーから成る、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項25】 捕捉用プローブが、感染仲介物に特異的な1つ又はそれより多くの標的核酸に対するLNAオリゴマーから成る、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項26】 捕捉用プローブが、感染仲介物の種、亜種、又は株に特異的な1つ又はそれより多くの標的核酸に対するLNAオリゴマーから成る、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項27】 捕捉用プローブが、遺伝性疾患に関するタンパク質をコードする遺伝子に特異的な1つ又はそれより多くの標的核酸に対するLNAオリゴマーから成る、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項28】 捕捉用プローブが、生活習慣病に関する遺伝子に特異的な1つ又はそれより多くの標的核酸に対するLNAオリゴマーから成る、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項29】 捕捉用プローブが、癌に関する遺伝子に特異的な1つ又はそれより多くの標的核酸に対するLNAオリゴマーから成る、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項30】 生活習慣病が、アテローム性硬化症及び疾患から成る群より選択される請求項28に記載の方法。

【請求項31】 固体表面が、ガラス、炭化水素ポリマー及び金属から成る群より選択される、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項32】 固体表面が微量力価プレートにおけるウエルの壁である、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項33】 固体表面がビーズの形態を有する、前記請求項いずれかに記載の方法。

【請求項34】 固体表面が平板の形態を有する、前記請求項いづれかに記載の方法。

【請求項35】 単離が一工程で行われる、前記請求項いづれかに記載の方法。

【請求項36】 リガンドがビオチンである請求項2及び3のいづれかに記載の方法。

【請求項37】 捕捉用プローブにハイブリッド形成した標的核酸が検出用プローブによって検出される、前記請求項いづれかに記載の方法。

【請求項38】 蛍光団、放射性同位元素、酵素、リガンド及びハプテン並びに抗原化合物から成る群より選択される標識によって検出用プローブが標識される請求項37に記載の方法。

【請求項39】 蛍光団が、フルオレセイン、ローダミン及びテキサス・レッドから成る群より選択される請求項38に記載の方法。

【請求項40】 放射性同位元素が、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>3</sup>S、<sup>12</sup>H、  
I及び<sup>14</sup>Cから成る群より選択される請求項38に記載の方法。

【請求項41】 酵素が、西洋ワサビのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、子ウシの腸のアルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ及びベーターガラクトシダーゼから成る群より選択される請求項38に記載の方法。

【請求項42】 リガンドが、ビオチン、チロキシン及びコルチゾールから成る群より選択される請求項38に記載の方法。

【請求項43】 検出用プローブが、捕捉用プローブ以外の固定化された標的核酸の別の領域にハイブリッド形成する請求項37～42のいづれかに記載の方法。

【請求項44】 検出用プローブが少なくとも1つのLNAモノマーを含有する請求項37～42のいづれかに記載の方法。

【請求項45】 捕捉用プローブに相補的であるヌクレオチド配列の核酸を増幅するための方法であって、

- a) 核酸を含有する試料を提供する工程、
- b) 試料中で細胞性物質を溶解分離し、成分を溶かし、及び試料中で核酸を変

性させるためにカオトロピック剤を含有する溶解緩衝液で試料を処理する工程、

c) 試料から遊離した核酸を固体表面に共有結合で付着した少なくとも1つの捕捉用LNAプローブに接触させる工程で、その際に前記捕捉用プローブは標的核酸に実質的に相補的であるような工程、

d) 余分な材料から固体表面を分離する工程、

e) 捕捉された核酸を適当量のヌクレオシド三リン酸及びヌクレオシド三リン酸の重合化剤と共に混合する工程、

f) 伸展産物を形成するために捕捉された核酸にハイブリッド形成するいかなるオリゴヌクレオチドも伸展する工程、その際に捕捉用LNAプローブが鋳型として使用されること、

g) 形成された伸展産物を検出する工程、

を含む方法。

【請求項46】 捕捉用プローブに相補的であるヌクレオチド配列の核酸を増幅するための方法であって、

- a) 核酸を含有する試料を提供する工程、
- b) 試料中で細胞性物質を溶解分離し、成分を溶かし、及び試料中で核酸を変性させるためにカオトロピック剤を含有する溶解緩衝液で試料を処理する工程、
- c) 試料から遊離した核酸を固体表面に共有結合で付着した少なくとも1つの捕捉用LNAプローブに接触させる工程であって、その際に前記捕捉用プローブは標的核酸に実質的に相補的であるような工程、
- d) 余分な材料から固体表面を分離する工程、
- e) 捕捉された核酸を適当量のヌクレオシド三リン酸及びヌクレオシド三リン酸の重合化剤と共に混合する工程、
- f) 伸展産物を形成するために捕捉された核酸にハイブリッド形成するいかなるオリゴヌクレオチドも伸展する工程であって、その際に捕捉用LNAプローブが鋳型として使用されるような工程、
- g) 更に伸展産物を形成するために、適当量のヌクレオシド三リン酸及びヌクレオシド三リン酸の重合化剤の存在下、工程c)の1本鎖核酸を少なくとも1つの下流のプライマーとハイブリッド形成させる工程、

- h) 伸展産物の検出可能な量を得るために十分な回数を介して工程g)を反復する工程、  
 i) 形成された伸展産物を検出する工程、  
 を含む方法。

【請求項47】 捕捉用プローブに相補的であるヌクレオチド配列の核酸を増幅するための方法であって、

- a) 核酸を含有する試料を提供する工程、
- b) 試料中で細胞性物質を溶解分離し、成分を溶かし、及び試料中で核酸を変性させるためにカオトロピック剤を含有する溶解緩衝液で試料を処理する工程、
- c) 試料から遊離した核酸を固体表面に共有結合で付着した少なくとも1つの捕捉用LNAプローブに接触させる工程であって、その際に前記捕捉用プローブは標的核酸に実質的に相補的であるような工程、
- d) 余分な材料から固体表面を分離する工程、
- e) 捕捉された核酸を適当量のヌクレオシド三リン酸及びヌクレオシド三リン酸の重合化剤及び少なくとも1つの下流のプライマーと共に混合する工程、
- f) 伸展産物を形成するために捕捉された核酸にハイブリッド形成するいかなるオリゴヌクレオチドも伸展する工程であって、その際に前記核酸が鋳型として使用されるような工程、
- g) 形成された伸展産物を検出する工程、  
 を含む方法。

【請求項48】 捕捉用プローブに相補的であるヌクレオチド配列の核酸を増幅するための方法であって、

- a) 核酸を含有する試料を提供する工程、
- b) 試料中で細胞性物質を溶解分離し、成分を溶かし、及び試料中で核酸を変性させるためにカオトロピック剤を含有する溶解緩衝液で試料を処理する工程、
- c) 試料から遊離した核酸を固体表面に共有結合で付着した少なくとも1つの捕捉用LNAプローブに接触させる工程であって、その際に前記捕捉用プローブは標的核酸に実質的に相補的であるような工程、
- d) 余分な材料から固体表面を分離する工程、

- e) 捕捉された核酸を適当量のヌクレオシド三リン酸及びヌクレオシド三リン酸の重合化剤及び少なくとも1つの下流のプライマーと共に混合する工程、
- f) 伸展産物を形成するために捕捉された核酸にハイブリッド形成するいかなるオリゴヌクレオチドも伸展する工程であって、その際に前記核酸が鋳型として使用されるような工程、
- g) 更に伸展産物を形成するために、適当量のヌクレオシド三リン酸及びヌクレオシド三リン酸の重合化剤の存在下、工程c) の1本鎖核酸を少なくとも1つの下流のプライマーとハイブリッド形成させる工程、
- h) 伸展産物の検出可能な量を得るために十分な回数を介して工程g) を反復する工程、
- i) 形成された伸展産物を検出する工程、  
を含む方法。

【請求項49】 標的核酸を単離するためのキットであって、

- a) 試料中の細胞性材料を溶解するためのカオトロピック剤を含有する溶解用緩衝液、及び、
- b) 少なくとも1つの捕捉用LNAプローブであって、前記捕捉用プローブが標的核酸に実質的に相補的であること、  
を含むキット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

(背景技術)

**関連技術の簡単な説明**

フェノール及びクロロホルムのような有機溶媒は、原核細胞及び真核細胞から、又は複合生物試料から核酸を単離するために用いられる技術で従来から使用されている。核酸の単離は典型的には、プロテアーゼによる酵素消化に始まり、イオン性界面活性剤を用いた細胞溶解、次いでフェノール又はフェノール／クロロホルム混合物による抽出が続く。有機相と水性相が分離され、水性相に位置する核酸はアルコールによる沈殿によって回収される。しかしながら、フェノール又はフェノール／クロロホルム混合物はヒトの皮膚に対して腐食性であり、慎重に扱い、適切に廃棄しなければならない有害廃棄物としてみなされている。更に、抽出方法は、時間と労力を要するものである。Marmur (J. Mol. Biol., 3:208~218, 1961) は、酵素処理、界面活性剤の添加、及びフェノール又はフェノール／クロロホルムのような有機溶媒の使用を用いた原核生物からの原型のままの高分子量DNAの抽出及び精製に関する標準調製法を記載している。Chirgwinら (Biochemistry, 18:5294~5299, 1979) は、GnSCNと2-メルカプトエタノールにおけるホモジネート次いでエタノール沈殿又は塩化セシウムを介した遠心分離による、リボヌクレアーゼで濃縮した組織からの原型のままのRNAの単離を記載している。更に方法の開発はAusubelらによって記載されている (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1998)。

**【0002】**

さらに、主として、カオトロピック塩は細胞の溶解を促進する一方で、ヌクレアーゼ及びプロテアーゼを阻害するという事実のために、グアニジンチオシアネート (GnSCN) のようなカオトロピック剤の使用は細胞から溶液に核酸を溶解し遊離するために広く用いられている。

**【0003】**

核酸のハイブリッド形成は、核酸を同定するために既知の立証された方法であ

る。ハイブリッド形成は、相補的な核酸の鎖の塩基対に基づいている。1本鎖核酸を適当な緩衝液中でインキュベートすると、相補的な塩基配列が対になって安定な2本鎖分子を形成する。数種の異なった公知の方法によってかかる対合の存在又は非存在を検出してもよい。

#### 【0004】

本発明に関連して、特に関心のある技術がDunn及びHasselによつてCell(12巻、23~36ページ、1977年)に記載された。彼らのアッセイはサンドイッチ型のもので、それによって『標的』核酸と固体の担体に固相化されている『捕捉』用核酸プローブとの間に第1のハイブリッド形成が生じる。次いで第2のハイブリッド形成が続き、その際、『シグナル』核酸は、典型的には蛍光団、放射性同位元素又は抗原決定基で標識されているが、それが、固相化された標的核酸の別の領域とハイブリッド形成する。次いで、例えば、蛍光光度計によってシグナルプローブのハイブリッド形成を検出してもよい。

#### 【0005】

Rankiらは米国特許第4,486,539号、同第4,563,419号及び欧州特許第0,079,139号の中で、先ず核酸を1本鎖にする工程を必要とし、次いで1本鎖核酸が、固体キャリアに貼り付けられた核酸及び放射性同位元素で標識された核酸とハイブリッド形成することができるサンドイッチ型のアッセイを記載している。従って、Rankiらのアッセイは、先ず1本鎖にされるべきアッセイにおいて同定されるべき又は標的とされるべき核酸を必要とする。

#### 【0006】

カオトロピック溶液において生物試料を溶解し、溶解した試料で直接、分子ハイブリッド形成を行う1つのアプローチはThompson及びGillespie(Aalytical Biochemistry, 163:281~291, 1987)によって記載されている。WO87/06621号も参考のこと。Coxらは核酸ハイブリッド形成アッセイを行い、細胞から核酸を単離するための方法におけるGnSCNに使用を記載している(欧州特許出願公開公報第0-127-327号)。

#### 【0007】

DNA又はRNAプローブによる分子ハイブリッド形成に好適な状態でニトロセルロース膜に捕捉し、固相化するために利用できる、生物資源におけるDNA又はmRNAを作成するために、Bresser、Doering及びGillespie (DNA, 2:243~254, 1983) はNaIの使用を報告し、Manser及びGeftter (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2470~2474, 1984) はNaSCNの使用を報告した。

### 【0008】

捕捉用プローブ及び検出用オリゴとしてのLNAの使用は今まで研究されてこなかった。LNAの普通とは異なる特徴のために、例えば純水又は界面活性剤及び高濃度の強力なカオトロピック剤を含有する緩衝液のような、DNA及びRNAが安定なハイブリッドを形成することができないような条件下で十分なハイブリッド形成を得ることが可能である。従って、捕捉用ハイブリッド形成、検出用ハイブリッド形成及び細胞溶解を1つの工程で行うことが可能である。これは、以前公表された方法の実質的な簡略化を提供する。

### 【0009】

#### (発明の開示)

本発明は、核酸のハイブリッド形成及び抽出のための組成物及びアッセイ方法に関する。特に本発明は、溶解中に遊離された相補的核酸を同時にハイブリッド形成させながら、複合生物試料又は検体における細胞から核酸を遊離するための組成物及び方法に関する。本発明の重要な成分は、それを *in vitro* におけるDNA診断を改善するための最上の候補にするような、普通とは異なった特徴を持つ、DNA類縁体の新規の部類であるLNAである。LNAのモノマーは構造的にはRNAモノマーに極めて似た二環式化合物である。式Iを参照のこと。LNAは、DNA及びRNAの化学的特性のほとんどを有しており、水溶性であり、電気泳動により分離することができ、エタノールで沈殿することができる。更に、LNAオリゴヌクレオチドは通常のホスフォアミダイト化学反応によって従来のように合成される。ホスフォアミダイト化学反応によってLNAモノマーとDNA(又はRNA)モノマーの両方を含有するキメラオリゴを合成することができる。従って、融点( $T_m$ )を事前に定めた混合LNA/DNAオリゴ

を調製することができる。ホスフォアミダイト合成のアプローチの柔軟性によつて、あらゆる市販のリンカー、蛍光団及びこの標準化学反応で利用できる標識分子を持つLNAの容易な製造が円滑になる。重要なことに、DNAオリゴ又はRNAオリゴのどちらかにLNAモノマーを導入することによって、ワトソン-クーリックの塩基対法則に従う一方で、相補的なDNA又はRNAとの二重らせんの前代未聞の高い温度安定性が生じる。一般に異種2本鎖の温度安定性は、2本鎖におけるLNAモノマー当り3~8°C上昇する。我々の知る限りでは、今までに報告された相補的DNA及びRNAに対してLNAは最も高い親和性を有する(Tetrahedron, 54:3607~3630, 1998)。LNA/DNA及びLNA/RNA異種2本鎖の温度安定性は十分に安定なので、グアニジンチオシアネート(GnSCN)のようなカオトロピック剤の存在下でさえ起きるような効率的なハイブリッドを形成することができる。

#### 【0010】

本発明は、ハイブリッド形成アッセイのために存在する核酸材料を調製し、利用できるようにするために複合生物試料又は検体における細胞から核酸を遊離するための新規の方法に関する。核酸のハイブリッド形成に関する新規の方法も提示する。特に、方法は、関心のある標的核酸を含有することが推測される試料からの核酸のハイブリッド形成について記載され、その際、試料は、LNAとのハイブリッド形成を可能にする一方で、細胞溶解及び細胞性の核酸の遊離を促進する少なくとも1つの強力なカオトロピック剤を含む緩衝液と混合される。次いで相補的核酸の標的核酸に対するハイブリッド形成の程度が測定される。

#### 【0011】

このようなハイブリッド形成法の1つの利点は、事前に混合された試薬とともに1つの簡単な工程でハイブリッド形成を行ってもよいことである。

#### 【0012】

##### (詳細な説明)

本発明は、核酸を含有する、溶解された複雑な生物混合物から遊離した核酸を検出するための新規の方法に関する。本発明の方法によって、細胞、細胞の一部、又はウイルスに存在することが推測される核酸、即ち標的核酸のための容易な

アッセイが可能になる。かかる方法には、強力なカオトロピック剤を含むハイブリッド形成媒質において細胞を溶解すること、ハイブリッド形成条件下にて細胞に存在することが推測される核酸配列に実質的に相補的なヌクレオチド配列を有するロック核酸（LNA）と溶解物を接触させること、及びハイブリッド形成の程度を測定することが含まれる。

#### 【0013】

『標的核酸』は、その存在に関心が向けられており、且つその存在又は非存在がハイブリッド形成アッセイによって検出されるべき、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（リボソームリボ核酸（rRNA）、転移RNA（tRNA）、小型核RNA（snRNA）、テロメラーゼ関連RNA、リボザイムなどを含む）のヌクレオチド配列を意味する。関心の向けられている核酸試料は、特定の遺伝子、遺伝子断片又はRNAのような標的核酸を含有することが推測されるものである。特に関心が持たれているのは、真核、原核、古生物又はウイルス起源の特定のmRNAの検出である。重要なこととして、本発明は、特定の微生物に関連することが知られている特定の配列に関してアッセイすることによって種々の感染疾患の診断に役立つことが可能である。標的核酸は、核酸（RNA、DNA及び／又はrRNA）と非核酸の複合生物混合物で提供されてもよい。まずここで取り上げられるべき標的核酸は、RNA分子であり、特に、本明細書に参考として組み入れられる、通常に譲渡された米国特許出願、出願番号第08/142,106号に記載された、16S及び23SのrRNAである。選択した標的核酸が2本鎖である、又はさもなければ重要な二次及び三次構造を有する場合、ハイブリッド形成の前にそれらを加熱する必要がある可能性がある。この場合、捕捉用プローブを含有するハイブリッド形成媒質に核酸を導入する前に又は後に加熱が起きててもよい。バックグランドの干渉を軽減するためにハイブリッド形成に先だって、公知の方法により複合生物試料から核酸を抽出することが望ましい場合もある。

#### 【0014】

本発明のハイブリッド形成法及び抽出法を、核酸（RNA及び／又はDNA）と非核酸の複合生物混合物に適用してもよい。かかる複合生物混合物は、プロト

プラスチック、又は標的核酸を有する可能性のあるその他の生物材料を含む幅広い真核細胞及び原核細胞を包含する。従って、該方法は、組織培養動物細胞、動物細胞（例えば、血液、血清、血漿、網状赤血球、リンパ球、尿、骨髓組織、脳脊髄液、又は血液又はリンパ液から調製されたいかなる産物）、又はいかなる種類の組織生検（例えば、溶解緩衝液中でホモジネートされた筋肉生検、肝臓生検、腎臓生検、膀胱生検、骨生検、関節生検、皮膚生検、脾臓生検、腸管の生検、胸腺生検、乳房生検、子宮生検、精巣生検、眼生検又は脳生検）、植物細胞又は浸透圧ショックに感受性の高いその他の細胞及び細菌、酵母、ウィルス、マイコプラズマ、原生動物、リケッチャ、真菌の細胞及びその他の小さな微生物細胞などに適用可能である。本発明のアッセイ及び単離法は、例えば、関心のある非病原性又は病原性微生物の検出に有用である。既知の起源のスクレオチドプローブと生物試料に存在する核酸との特異的なハイブリッド形成を検出することによって、微生物の存在を立証してもよい。

#### 【0015】

高濃度のグアニジン、グアニジンチオシアネート又は特定のその他のカオトロピック剤及び界面活性剤を含有する溶液は、同時に LNA プローブと遊離した内因性の核酸との特異的なハイブリッド形成を可能にする一方で、原核細胞及び真核細胞を効率的に溶解することができる。細胞の溶解及び溶解性並びに核酸のハイブリッド形成を促進するために、溶液は、通常の緩衝液及び界面活性剤以外のいかなる他の成分を含有する必要もない。

#### 【0016】

ハイブリッド形成に先だって、抽出を採用する場合、核酸を単離するのに用いる技術においてフェノール及びクロロホルムのような有機溶媒を使用してもよい。相分離を用いて核酸を抽出するのに、従来からフェノール又はフェノール／クロロホルム混合物のような有機溶媒が使われている (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1998)。本発明も溶解溶液と共にこのような方法を効率的に用いてもよい；しかしながら、本発明の方法の利点は、冗漫な抽出法を必要としないことであり、従って、処理能力の高いアッセイの性能を改善している。好ましくは、一方で依然として LNA プロー

ブの効率的なハイブリッド形成を可能にしながら、細胞の溶解を促進するために、溶解緩衝液／ハイブリッド形成媒質は、通常の緩衝液及び界面活性剤を含有する。クエン酸ナトリウム、トリスH C 1、P I P E S又はH E P E S、好ましくは約0. 0 5～0. 1 Mの濃度でのトリスH C 1を使用することができる。ハイブリッド形成媒質は好ましくは、約0. 0 5～0. 5 %のイオン性又は非イオン性の界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（S D S）又はサルコシル（ミズーリ州、セントルイスのシグマケミカル社製）、及び1～1 0 mMのE D T Aも含有する。他の添加剤、例えば、陰イオンポリアクリレート又はポリメタクリレートのような極性水溶性又は膨張可能剤、及びデキストランサルフェートなどのような荷電糖ポリマーを含有する体積調整剤のようなものを包含してもよい。例えば、カオトロピック剤の濃度及び種類並びに例えば0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、又は1. 0のような典型的には0～1 MのN a C 1のN a C 1濃度を変えることによって、ハイブリッド形成の特異性及び厳密性を制御してもよい。

### 【0 0 1 7】

天然に生じる核酸を解離し、ヌクレアーゼを阻害するために、例えば、塩酸グアニジン（G n H C 1）及びグアニジンチオシアネート（G n S C N）のようなグアニジン塩、又は尿素、塩化リチウム及びその他のチオシアネートのような、タンパク質の二次構造及び三次構造を妨害するカオトロピック剤を、界面活性剤、及び、例えばベータメルカプトエタノール又はD T Tのような還元剤と組合せて使用してもよい。核酸の抽出及びハイブリッド形成におけるカオトロピック剤の使用は、参考として本明細書に組み入れる欧州特許公開第0, 1 2 7, 3 2 7号に記載されている。

### 【0 0 1 8】

上記の標的核酸に、実質的に相補的なL N Aがハイブリッド形成工程に導入される。用語『標的核酸に実質的に相補的なL N A』は、ハイブリッド形成の条件下にて当該標的核酸と相補的な核酸との間に安定且つ特異的な結合が生じるように標的核酸とハイブリッド形成するのに十分相補的である、少なくとも1つのL N Aモノマー及び変動する数の天然のヌクレオチド又は例えば7-デアザグアノ

シン又はイノシンのようなその類縁体を含有するポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドをいう。従って、LNAの配列は標的核酸の正確な配列を反映する必要はない。例えば、相補的な核酸配列が標的核酸の配列とハイブリッド形成するのに十分なくらい相補的であり、それと共にハイブリッド形成複合体を形成し、更に、以下で詳しく説明するように標的核酸を固体の担体に固相化することができるという条件で、非相補的なヌクレオチド断片が相補的断片に接続してもよいし、又は別の方法として、非相補的塩基若しくは更に長い配列が相補的核酸の中で分散することができる。遊離した核酸に結合するべき捕捉用プローブを基（例えば、ビオチン、フルオレセイン、磁気微粒子など）に連結することができる。別の方法としては、例えばアントラキノン光化学反応によって、あらかじめ捕捉用プローブを永久に固体の担体又は粒子に結合することができる（WO 96/31557）。

#### 【0019】

本発明における関心を引く可能性は、配列形式（array format）において点状配置され、永続的に表面に貼りつけられているゲノムにおける様々な配列に対して様々なLNAオリゴマーを使用することである（Nature Genetics, suppl., 21:1~60, 1999及びWO 96/31557）。続いて、溶解した細胞及び多数の好適な検出用LNAプローブを含有する溶解緩衝液／ハイブリッド形成媒質の混合物と共に、かかる配列をインキュベートすることができる。次いで、溶解及びハイブリッド形成を生じることができ、最終的に配列を洗浄し、適当な発色反応を行う。かかる方法の結果は、大量の異なった標的核酸の半定量的評価とし得る。

#### 【0020】

DNA又はRNAに関しては、LNAを含む安定なハイブリッド形成複合体（二重らせん）の形成に必要とされる相補性の程度は、ハイブリッド形成媒質及び／又は洗浄媒質の厳密性によって変化する。相補的な核酸は、事前に調製されたハイブリッド形成用媒質の中に存在してもよいし、ハイブリッド形成に先立つ少し後の時点で導入されてもよい。

#### 【0021】

細胞の溶解及び核酸の対合を促進するために、ハイブリッド形成用媒質を生物試料と混合する。好ましくは、生物試料の容積とハイブリッド形成用媒質の容積は約1：10である。

#### 【0022】

複合生物試料に対して1つの工程でそれらを行うことが意図されており、それはまた本発明のハイブリッド形成法の利点にもなっている。しかしながら、特定の状況下では、些細な機械的処理又はその他の処理を考慮してもよい。例えば、低速遠心又は濾過によってハイブリッド形成の前に溶解物を清浄にすること、又は上述したようにハイブリッド形成の前に核酸を抽出することを所望してもよい。

#### 【0023】

当業者に既知のいかなる方法によっても、又は本明細書に提示された指針に与えられた免疫アッセイ法に類似したいかなる方法によっても、本発明のハイブリッド形成アッセイを行うことができる。アッセイの好ましい方法は、サンドイッチ・アッセイ及びその変法又は置き換えアッセイである。ハイブリッド形成技術は一般に『Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach (核酸のハイブリッド形成、実践的アプローチ)』(Ed. Hames, B. D. and Higgins, S. J., IRL Press, 1985) ; Gal11 及びPardue (1969年) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63:378-383) : 及びJohn, Burnstevil 及びJones (1969年) (Nature, 223:582-587) に記載されている。ハイブリッド形成技術における更なる改善は当業者に知られており、容易に適用することができる。

#### 【0024】

本発明では、典型的には捕捉用DNAプローブを、例えば微量力値トレイのウエル表面又はマイクロビーズの表面のような固体表面に付着する。従って、好都合で極めて効率的な洗浄法を実行することができ、発明の性能に加えられてもよい、種々の酵素に基づいた反応に対する可能性が開かれている。最も注目に値することは、ハイブリッド形成アッセイの感度が、検出される標的核酸を増やす核酸增幅システムを使用することによって高められるという可能性である。かか

るシステムの例には、ポリメラーゼ鎖反応（P C R）システム及びリガーゼ鎖反応（L C R）システムが挙げられる。最近記載され、当業者に既知のその他の方法は、核酸配列に基づいた増幅（N A S B A：登録商標、オンタリオ州、ミシサーガのキャンジーン）及びQベータレプリカーゼシステムである。P C Rは選択されたD N A配列を複製する、鑄型に依存したD N Aポリメラーゼのプライマー伸展の方法である。方法は、D N Aポリヌクレオチドの特異的な一部配列のD N Aポリメラーゼによる複製を開始するために過剰量の特異的なプライマーを使用し、続いて変性とポリメラーゼによる伸展の工程を反復することに基づいている。P C Rシステムは当該技術で周知である（米国特許第4, 683, 195号及び米国特許第4, 683, 202号を参照のこと）。P C R法に関する更なる情報については、P C Rプロトコール：方法と応用のガイド（Ed. Innis, Gelland, Shinsky and White, Academic Press, Inc., 1990）も参考のこと。P C Rを行うための試薬及びハードウエアはコネチカット州、ノーウォークのパーキンエルマー／セータスインストルメンツ（Perkin-Elmer/Cetus Instruments）を介して市販されている。

#### 【0025】

L C RはP C R同様、交互に変化する温度のサイクルを複数使用して目的のD N A配列の数を増幅する。しかしながら、L C Rは鑄型の伸展のために個々のヌクレオチドを使用しない。代わりにL C Rは、目的領域の両鎖に相補的である過剰量のオリゴヌクレオチドに基づいている。2本鎖鑄型D N Aの変性に続いて、L C R法は目的鎖の1つに隣接した領域に相補的な2つのオリゴヌクレオチドプライマーの連結を開始する。どちらの鎖に相補的なオリゴヌクレオチドも接続することができる。連結及び2回目の変性の後、最初の鑄型と新しく2個の接続された産物が次の連結の鑄型として働き、目的配列の指数的増幅を提供する。この方法は、G e n o m i c s 第4巻の560～569ページ（1989年）に詳述されており、参考として本明細書に組み入れられる。他の増幅システムも開発されているので、本発明における使用を見い出してもよい。

#### 【0026】

本発明のハイブリッド形成用媒質及びハイブリッド形成法は独自の1工程アッ

セイに適している。ハイブリッド形成に必要なあらゆる成分を含有するように商業的に又は実験室規模で事前に媒質を調製してもよい。例えば、例えばサンドイッチアッセイでは、媒質はカオトロピック剤（例えばグアニジンチオシアネート）、所望の緩衝液及び界面活性剤、マイクロビーズのような固体の担体に結合させた捕捉用LNAプローブ、及びLNAであってもよい検出用核酸を含むことができる。その後、この媒質は実行すべきアッセイ時に標的核酸を含有する試料を混合することが必要なだけである。いったんハイブリッド形成が起きると、固体の担体に付着させたハイブリッド複合体を洗浄してもよく、ハイブリッド形成の程度を測定してもよい。

#### 【0027】

サンドイッチアッセイは、核酸配列を検出する、又は単離するために、商業的に有用なハイブリッド形成アッセイである。かかるアッセイは、固体の担体に共有結合で固相化された『捕捉用』核酸及び溶液中で標識された『シグナル』核酸を利用する。試料は標的核酸を提供する。『捕捉用』核酸及び『シグナル』核酸プローブは標的核酸とハイブリッド形成して、『サンドイッチ状態』のハイブリッド複合体を形成する。効果的にするのは、シグナル核酸が捕捉用核酸とはハイブリッド形成しないが、捕捉用プローブとは異なった位置で標的核酸とハイブリッド形成するように、シグナル核酸を設計する。

#### 【0028】

実際、ハイブリッド形成アッセイのための担体として金属及びプラスチックを含めていかなる固体表面も使用することができる。一般に2種類の固体表面を利用することができる。即ち、

- 核酸又はオリゴヌクレオチドを固相化することができる固体表面の基体として使用するのに、膜、ポリスチレンビーズ、ナイロン、テフロン（登録商標）、ポリスチレン／ラテックスビーズ、ラテックスビーズ、又は活性化カルボキシレート、スルホネート、リン酸基又は類似の活性化が可能な基を持つ固体の担体が好適である。
- 商業的に入手（例えば、ニューヨーク州イーストヒルのポール・バイオサポート・ディビジョンのポールイムノダイン・イムノアフィニティ膜、又はマサ

チューセツ州、ベッドフォードのミリポアからのイムノビロン・アフィニティ膜) してもよく、且つ捕捉用オリゴヌクレオチドを固相化するのに使用してもよい事前に活性化された表面を持つ多孔性膜、磁気ビーズ、ポリエチレン、テフロン、ナイロン、シリカ又はラテックスビーズを含むミクロビーズも使用してもよい。

### 【0029】

しかしながら、特に核酸の複合体混合物及びその他の溶解された生体分子をハイブリッド形成によって分析する場合、上記a) 及びb) に記載された一般的に利用できる表面の使用はバックグラウンドの問題を起こすことが多い。当該技術（WO 96/31557を参照のこと）に記載されているアントラキノン（AQ）を基にした光カップリング法によって捕捉用プローブを固体表面に共有結合で付着すると、バックグラウンドの有意な低下が得られている。この方法によって、処理されたガラス表面同様に、ポリカーボネート及びポリエチレンのような相対的に熱安定性のポリマーを含めたほとんどのポリマー素材の表面への捕捉用LNAオリゴの共有結合による付着が可能になる。従って、AQ一光カップリング法の使用によって、今日のPCR增幅技術に適合する容器の表面に捕捉用LNAプローブを付着することができる。

### 【0030】

生物のゲノム全体の配列又はその一部、メッセンジャーRNA、又はメッセンジャーRNAの逆転写で得られたcDNAから、ハイブリッド形成アッセイで使用するための捕捉用又はシグナル用核酸に好適な配列を得ることができる。かかる得られた配列からヌクレオチド配列を得る方法は公知である（Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, pub John Wiley & Sons, 1998 及びSambrook et al., in Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照のこと）。更に、関連配列入手するには、多数の公的な及び商業的な配列データベースにアクセスすることが可能であり、交渉することができる。

### 【0031】

いったん適切な配列を決定したら、当該技術で記載された（Tetrahedron, 54:

3607~30, 1998) ような市販の方法及び装置を用いて、好ましくはLNAプローブを化学的に合成する。例えば、短いLNAプローブを作製するのに固相ホスフォアミダイト法を用いることができる (Caruthers et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47:411~418, 1982; Adams et al., J. Am. Chem. Soc., 105:661, 1983)。

#### 【0032】

特定の標的に対するプローブを合成する場合、ヌクレオチド配列の選択は試験の特異性を決定する。例えば、数種のウイルス単離物からのDNA配列を比較することによって種に特異的又は属に特異的のどちらかであるウイルスの検出のための配列を選択することができる。市販のコンピュータプログラムを用いて、DNA領域と配列の比較を達成することができる。

#### 【0033】

当該技術で周知の方法のいずれかによってハイブリッド形成の程度の測定を行ってもよい。検出可能なハイブリッド形成がない場合、ハイブリッド形成の程度は0である。典型的には、ハイブリッド形成を検出するのには標識されたシグナル核酸を使用する。ハイブリッド形成したポリヌクレオチドの存在を検出するために典型的に使用される数種の方法のいずれか1つによって相補的核酸又はシグナル核酸を標識してもよい。最も一般的な検出法は、標識された抗体、蛍光団又は化学発光剤に結合するリガンドの使用である。しかしながら、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>33</sup>P又は<sup>32</sup>Pでプローブを標識し、続いてオートラジオグラフィで検出してもよい。放射性同位元素の選択は、合成の容易さ、変化する安定性、及び選択した同位元素の半減期による研究の優先性に依存する。その他の標識には、標識されたリガンドに対する特異的な結合相手として作用する抗体が挙げられる。標識の選択は、必要とされる感度、プローブとの共役の容易さ、安定性の必要性、及び利用可能な設備に依存する。

#### 【0034】

LNAプローブは典型的には合成中に標識される。ホスフォアミダイト合成法の柔軟性によって、市販のリンカー、蛍光団及びこの標準的な化学反応に利用できる標識分子を持つLNAの容易な製造が促進される。例えばキナーゼのような

酵素反応によってLNAを標識してもよい。

### 【0035】

検出用プローブがDNA又はRNAであるような状況も想定される。標識の選択によって種々の方法でかかるプローブを標識することができる。典型的には、所望の放射性同位元素を含有する市販のヌクレオチドを用いて放射性プローブが作製される。2本鎖プローブのニックトランスレーション；放射性dNTPの存在下DNAポリメラーゼのクレノウ断片を持った特異的挿入部を有する1本鎖M13プラスミドをコピーすること；放射性dNTPの存在下にて逆転写酵素を用いてRNA錆型からcDNAを転写すること；放射性rNTPの存在下にてSP6又はT7RNAポリメラーゼを用いてSP6プロモータ又はT7プロモータを含有するベクターからRNAを転写すること；ターミナルトランスフェラーゼを用いて放射性ヌクレオチドをプローブの3'末端に接続すること；又は[32P]-ATP及びポリヌクレオチドキナーゼを用いたプローブの5'末端のリン酸化のような数種の手段によって放射性ヌクレオチドをプローブに組み入れることができる。

### 【0036】

間接的手段によって非放射性プローブを標識することが多い。一般に、リガンド分子がプローブに共有結合される。次いで、固有に検出可能である抗リガンド分子、又は検出可能な酵素、蛍光化合物、又は化学発光化合物のようなシグナルシステムに共有結合した抗リガンド分子のどちらかにリガンドが結合する。リガンド及び抗リガンドは幅広く異なってもよい。リガンドが例えば、ビオチン、チロキシン及びコルチゾールのような天然の抗リガンドを有する場合、標識された天然の抗リガンドと共に使用することができる。別の方法としては、抗体と組合せてハプテン化合物又は抗原化合物を使用することができる。

### 【0037】

DNAと同様に、例えば、酵素又は蛍光団との共役によって、シグナル発生化合物に直接LNAプローブを共役させることもできる。標識として関心のある酵素は、主として加水分解酵素、特にホスファターゼ、エステラーゼ及びグリコシダーゼ又はオキシドレダクターゼ、特にペルオキシダーゼである。蛍光化合物に

は、フルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどが挙げられる。化学発光化合物には、ルシフェリン、AMPD（[3-（2'-スピロアマンタン）-4-メトキシ-4-（3'-ホスフオリコキシ）フェニル-1,2-ジオキセタン]）及び2,3-ジヒドロフタルアジネジョン、例えばルミノールが挙げられる。

#### 【0038】

ハイブリッド形成用媒質又は抽出用溶液に存在する標識されたプローブの量は広く変化してもよい。一般に、プローブの標的DNAへの結合比率を高めるために標的核酸の理論的な量に対して実質的に過剰量のプローブが用いられる。市販の超音波水槽に反応容器を浸すことにより超音波処理を行うことによってハイブリッド形成比率が加速されることが多い。

#### 【0039】

使用した特定のハイブリッド形成溶液に適した温度及び時間にてハイブリッド形成を行った後、捕捉用LNAプローブ：標的核酸ハイブリッド複合体が付着されている担体を、典型的にはハイブリッド形成溶液で提供されたものと類似の試薬（例えば、塩化ナトリウム、緩衝液、有機溶媒及び界面活性剤）を含有する洗浄用溶液に導入する。これらの試薬はハイブリッド形成用媒質と同じような濃度でもよいが、更に厳密な洗浄条件が所望の場合は、それらは更に低い濃度である。 担体を洗浄用溶液内で維持する時間は、数分から数時間以上変化してもよい。

#### 【0040】

ハイブリッド形成用媒質又は洗浄用媒質のどちらかを厳密にすることができる。適當な厳密性で洗浄した後、今や標識の性質に従って正確なハイブリッド複合体が検出される。

#### 【0041】

標識に直接プローブを共役させてもよい。例えば、標識が放射性物質の場合、ハイブリッド複合体の基質に会合したプローブがX線フィルムに感光される。標識が蛍光物質の場合、特定の波長の光でそれを先ず照射することによって試料は検出される。試料はこの光を吸収し、別の波長の光を遊離するが、これを検出器

で捉える。(Physical Biochemistry, Freifelder, D., W.H. Freeman & Co, 537~542, 1982)。標識が酵素の場合、酵素に対して適当な基質とともにインキュベートすることによって試料は検出される。発生されるシグナルは、有色の沈殿物、有色の、又は蛍光の可溶性物質、若しくは生物発光又は化学発光により生じる光子であってもよい。プローブのアッセイに好ましい標識は、例えば、西洋ワサビのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、子ウシの腸のアルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ及びベーターガラクトシダーゼのような、陽性の読み取りを示す有色の沈殿を生じる。例えば、アルカリホスファターゼは、インドキシリルリン酸を脱リン酸化し、次いで還元反応に加わり、テトラゾリウム塩を色の強い不溶性のホルマザンに変換する。

#### 【0042】

ハイブリッド形成複合体の検出は、標的とプローブのポリヌクレオチド又は核酸の二重らせんに対するシグナルを発生している複合体の結合を必要としてもよい。典型的には、かかる結合は、リガンドと共に役するプローブ及びシグナルと共に役された抗リガンドの間のリガンドと抗リガンドの相互作用を介して起きる。シグナル発生複合体の結合も超音波エネルギーへの暴露によって容易に敏感に反応して加速される。

#### 【0043】

標識によってハイブリッド形成複合体の間接的検出が行えてもよい。例えば、標識がハプテン又は抗原である場合、抗体を用いて試料を検出することができる。このようなシステムでは、抗体に蛍光分子又は酵素分子を結合することによって、又は時には放射性標識に結合することによってシグナルが発生する(Tijssen, P., "Practice and Theory of Enzyme Immunoassay", Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burdon, R. H., van Knippenberg, P.H., Eds., Elsevier, 9~20, 1985)。

#### 【0044】

ここで、用語『標識』は、従って、それ自体によって又は検出シリーズの一部として検出可能な基を意味する。リポーター基の官能部分の例は、ビオチン、ジゴキシゲニン、蛍光基(例えば、光又はX線のような、特定の電磁波照射を吸収

することができる、及び更に長い波長の放射として吸収されるエネルギーを続いて再遊離する基で；例証的な例は、ダンシル（5-ジメチルアミノ）-1-ナフタレンスルホニル）、DOXYL（N-オキシル-4, 4-ジメチルオキサゾリジン）、PROXYL（N-オキシル-2, 2, 5, 5-テトラメチルピロリジン）、TEMPO（N-オキシル-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン）、ジニトロフェニル、アクリジン、クマリン、Cy3及びCy5（バイオロジカル・ディテクション・システムズ社の商標）、エリトロシン、クマリン酸、ウンベリフェロン、テキサス・レッド、ローダミン、テトラメチルローダミン、ROX、7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1-ジアゾール（NBD）、ピレン、フルオレセイン、ユーロピウム、ルテニウム、サマリウム、及びその他の希土類金属である）、放射性標識、化学発光標識（化学反応中の光の遊離を介して検出可能な標識）、スピノ標識（フリーラジカル（例えば、置換された有機ニトロキシド）又は電子スピノ共鳴分光計を用いて検出することができる生体分子に結合したその他の常磁性プローブ（例えば、Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>））、酵素（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、及びグルコースオキシダーゼ）、抗原、抗体、ハプテン（ペプチド及びステロイドホルモンのような抗体に結合することはできるが、それ自体で免疫反応を開始することができない基）、例えば、脂肪酸残基、ステロイド部分（コレステリル）、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンE、特異的な受容体に対する葉酸ペプチドのような細胞膜透過のキャリアシステム、エンドサイトーシスに介在する基、上皮増殖因子（EGF）、プラジキニン、及び血小板由来増殖因子（PDGF）である。特に関心のある例は、ビオチン、フルオレセイン、テキサス・レッド、ローダミン、ジニトロフェニル、ジゴキシゲニン、ルテニウム、ユーロピウム、Cy5、Cy3などである。

### 【0045】

RNAの単離に関しては、イソチオシアネート塩（例えば、グアニジンチオシアネート）のようなカオトロピック剤はタンパク質と核酸の相互作用の完全な破壊を提供しないので、最適なハイブリッド形成が妨げられることが記載されている（米国特許第5, 376, 529号）。カオトロピック剤及び標的核酸を含

有するハイブリッド形成用溶液に熱を適用すると、ハイブリッド形成における有意な増加が起きると報告された。以前、研究者達は、反応物質の安定性を維持するためにハイブリッド形成温度を低く保つよう努めてきた。Coxらの欧州特許出願第84302865.5号を参照のこと。しかしながら、LNA/DNA及びLNA/RNAの異種二重らせんの熱安定性が有意に高いことによってLNAプローブとのハイブリッド形成は高い温度で実現可能となっている。従って、本発明は、リボ核酸検出アッセイの感度を高め、アッセイの工程を簡略化する方法を提供する。標的核酸がRNAである核酸のハイブリッド形成を行う方法は、当該技術（米国特許第5,376,529号）に記載されるように、例えば70～100℃のような高い温度に核酸溶液又は試料を加熱することを含む。本発明の核酸溶液は、カオトロピック剤、標的核酸及び関心のある標的核酸に実質的に相補的なLNAを含む。タンパク質と核酸の相互作用を完全に破壊するために核酸溶液を加熱して、LNAとその標的との間のハイブリッド形成を最大にする。高親和性のLNAプローブを用いる場合、DNA:DNA及びDNA:RNAの相互作用を完全に破壊するのに必要な高い温度でハイブリッド形成を行ってもよい。次いで相補的な核酸が標的核酸とハイブリッド形成してハイブリッド複合体を形成するまで溶液を冷却する。

#### 【0046】

これらの方法はそれによって試料及びアッセイ試薬の取り扱いを最小限にすることができるので更に有利である。例えば、カオトロピック剤、緩衝液又は界面活性剤のようなその他の適当な成分、固体の担体に結合した捕捉用LNAプローブ、及び両方共標的核酸とハイブリッド形成することができるシグナル用又は検出用LNA（又は核酸）を含有する、使用準備済みの試薬溶液を提供してもよい。好都合なことに、標的核酸を抱いていることが推測される複合生物試料をハイブリッド形成用に事前に調製した試薬に直接混合することができ、従って、1工程でハイブリッド形成を行うことができる。混合した溶液を本明細書で記載するように加熱し、次いでハイブリッド形成が起きるまで冷却する。ハイブリッド形成しなかった物質を除くために得られたハイブリッド複合体を単に洗浄し、ハイブリッド形成の程度を測定する。

## 【0047】

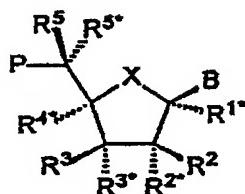
核酸、例えばmRNAの抽出及びハイブリッド形成のためのキットも考慮される。かかるキットは、強力なカオトロピック剤及び固体の担体に結合した捕捉用LNAプローブを含む抽出溶液又はハイブリッド形成用媒質を含有する少なくとも1つのバイアルを含有する。界面活性剤、緩衝溶液及び標的核酸を検出する成分を含む追加バイアルも包含されてもよい。

## 【0048】

本明細書で使用するとき、用語『LNA』又は『補足用LNAプローブ』は一般式Iの核酸類縁体を少なくとも1つ含むオリゴマー及びその塩基性塩及び酸付加塩をいう：

## 【0049】

## 【化1】



## 【0050】

(式中、Xは-O-、-S-、-N(RN\*)-、-CR6(R6\*)-から選択され；Bは核酸塩基から選択され、Pは続くモノマーへのヌクレオチド間結合のためのラジカル位、又は任意で置換基R5を含む、ヌクレオチド間結合又は5'-末端基のような5'末端基を表し；

R3又はR3\*は先行するモノマーに対するヌクレオチド間結合、又は3'末端基を表すP\*であり；

R4\*及びR2\*は共に-C(RaRb)-、-C(Ra)=C(Ra)-、-C(Ra)=N-、-O-、-Si(Ra)2-、-S-、-SO2-、-N(Ra)-及び>C=Zから選択される1-4基／原子から成るバイラジカルを表し、

式中、Zは-O-、-S-、及び-N(Ra)-から選択され、Ra及びRb

は独立して水素、任意で置換されたC 1～12のアルキル、任意で置換されたC 2～12のアルケニル、任意で置換されたC 2～12のアルキニル、ヒドロキシ、C 1～12のアルコキシ、C 2～12のアルケニロキシ、カルボキシ、C 1～12のアルコキシカルボニル、C 1～12のアルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリーコキシカルボニル、アリーコキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリーコキシカルボニル、ヘテロアリーコキシ、ヘテロアリーコカルボニル、アミノ、モノ及びジ(C 1～6のアルキル)アミノ、カルバモイル、モノ及びジ(C 1～6のアルキル)アミノカルボニル、アミノC 1～6のアルキルアミノカルボニル、モノ及びジ(C 1～6のアルキル)アミノC 1～6のアルキルアミノカルボニル、C 1～6のアルキルカルボニルアミノ、カルバミド、C 1～6アルカノイロキシ、スルホノ、C 1～6アルキルスルホヌロキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C 1～6のアルキルチオ、ハロゲン、DNA挿入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンド、その際アリールとヘテロアリールは任意で置換されてもよく、及びその際、双子の置換基R a及びR bは共に、任意で置換されたメチレン(=CH<sub>2</sub>、アリールに対する任意の置換基として定義されたような置換基で1回又は2回任意で置換された)を表してもよく；且つ

存在するがP又はP\*に関与しない置換基R 1\*、R 2、R 3、R 3\*、R 5、R 5\*、R 6、及びR 6\*はそれぞれ独立して水素、任意で置換されたC 1～12のアルキル、任意で置換されたC 2～12のアルケニル、任意で置換されたC 2～12のアルキニル、ヒドロキシ、C 1～12のアルコキシ、C 2～12のアルケニロキシ、カルボキシ、C 1～12のアルコキシカルボニル、C 1～12のアルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリーコキシカルボニル、アリーコキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリーコキシカルボニル、ヘテロアリーコキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノ及びジ(C 1～6のアルキル)アミノ、カルバモイル、モノ及びジ(C 1～6のアルキル)アミノカルボニル、アミノC 1～6のアルキルアミノカルボニル、モノ及びジ(C 1～6のアルキル)アミノC 1～6のアルキルアミノカルボニル、C 1～6のアルキルカルボニルアミノ、カルバミド、C 1～6のアルカノイロキシ、スルホノ、

C 1～6 のアルキルスルホニロキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C 1～6 のアルキルチオ、ハロゲン、DNA挿入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンド（その際、後者の基は、置換基Bに対して定義されたようなスペーサーを包含してもよい）から選択され、その際、アリール及びヘテロアリールは任意で置換されてもよく、且つその際、2つの双子の置換基は共に、オキソ、チオキソ、イミノを表してもよく、又は任意で置換されたメチレンを表してもよく、又は共に、RNが水素及びC 1～4 のアルキルから選択される-O-、-S-、及び-(N R N)-から選択される1又はそれより多くのヘテロ原子/基によって任意で介在される及び/又は停止される1～5の炭素原子のアルキレン鎖から成るスピロバイラジカルを形成してもよく、及びその際、2つの隣接した置換基（双子ではない）は追加の結合を表して二重結合となってもよく；且つRN\*は存在するが、バイラジカルに関与しない場合、水素及びC 1～4 のアルキルから選択される。）

### 【0051】

本明細書で使用するとき、用語『DNA』（ロックヌクレオシド類縁体）は、オリゴマー（一般式I）に組み入れられた二環式ヌクレオシド類縁体をいう。

### 【0052】

本背景では、用語『核酸塩基』は、非天然に生じる核酸塩基と同様に天然に生じる核酸塩基も網羅する。従来『非天然に生じる』とみなされていた種々の核酸塩基が次々と天然に見い出されていることは当業者に明らかにされるべきである。従って、『核酸塩基』は、既知のプリン及びピリミジン複素環のみならず、その複素環類縁体及び互変体を包含する。核酸塩基の例証的な例は、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、プリン、キサンチン、ジアミノプリン、8-オキソ-N 6-メチルアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、N 4, N 4-エタノシトシン、N 6, N 6-エタノ-2, 6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、5-(C 3-C 6) アルキニルシトシン、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、偽イソシトシン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシン、及びB ennerらが米国特許第5, 432, 272号で記載した「非天然に生じる」

核酸塩基である。用語『核酸塩基』はあらゆる及びすべてのこのような例及びその類縁体並びに互変体を網羅することを意図する。特に関心のある核酸塩基は、ヒトの治療応用及び診断応用に関連する天然に生じる核酸塩基であるとみなされているアデニン、グアニン、チミン、シトシン、及びウラシルである。

#### 【0053】

本明細書で使用されるとき、用語『DNA挿入剤』は、DNA又はRNAらせん、二重らせん、又は三重らせんに挿入することができる基をいう。DNA挿入剤の官能的部分の例は、アクリジン、アントラセン、アントラキノンのようなキノン、インドール、キリノン、イソキノリン、ジヒドロキノン、アントラサイクリン、テトラサイクリン、メチレンブルー、アントラサイクリノン、プソラレン、クマリン、エチジウムハロゲン化合物、ダイネミシン、1, 10-フェナントロリン銅のような金属錯体、カルケアマイシンのようなトリス(4, 7-ジフェニル-1, 10-フェナントロリン)ルテニウム-コバルト-エネジイン、ポフュリンズ、ジスタマイシン、ネトロプシン、ビオロゲン、ダウノマイシンである。特に関心のある例は、アクリジン、アントラキノンのようなキノン、メチレンブルー、プソラレン、クマリン及びエチジウムハロゲン化合物である。

#### 【0054】

ここで、用語『光化学的に活性化された基』は、光照射のもとで化学反応をうけることができる化合物を網羅する。その官能基の実証的な例は、キノン、特に6-メチル-1, 4-ナフトキノン、アントラキノン、ナフトキノン、及び1, 4-ジメチルアントラキノン、ジアジリン、芳香族アジド、ベンゾフェノン、プソラレン、ジアゾ化合物、及びジアジリノ化合物である。

#### 【0055】

ここで、『熱化学的に反応性の基』は、他の基との熱化学的に誘導された共有結合の形成を受けることができる官能基として定義される。熱化学的に反応性の基の官能部分の実証的な例は、カルボン酸、活性化エステルのようなカルボン酸エステル、酸フッ化物、酸塩化物、酸臭化物及び酸ヨウ化物のようなカルボン酸ハロゲン化合物、カルボン酸アジド、カルボン酸ヒドラジド、スルホン酸、スルホン酸エステル、スルホン酸ハロゲン化合物、セミカルバジド、チオセミカルバ

ジド、アルデヒド、ケトン、第1級アルコール、第2級アルコール、第3級アルコール、フェノール、アルキルハロゲン化合物、チオール、ジスルフィド、第1級アミン、第2級アミン、第3級アミン、ヒドラジド、エポキシド、マレイミド及びホウ酸誘導体である。

### 【0056】

ここで、用語『キレート基』は、1つより多くの結合部位を有し、1つより多くの結合部位を介して同時に他の分子、原子又はイオンと頻繁に結合する分子を意味する。キレート基の官能部分の例は、イミノ二酢酸、ニトロ三酢酸、エチレンジアミン四酢酸（E D T A）、アミノホスホン酸などである。

### 【0057】

ここで、『リガンド』は結合する何かを意味する。リガンドは、例えば、芳香族基（例えば、ベンゼン、ピリジン、ナフタレン、アントラセン、及びフェナントレン）、ヘテロ芳香族（例えば、チオフェン、フラン、テトラヒドロフラン、ピリジン、ジオキサン、及びピリミジン）、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルボン酸ハロゲン化合物、カルボン酸アジド、カルボン酸ヒドラジド、スルホン酸、スルホン酸エステル、スルホン酸ハロゲン化合物、セミカルバジド、チオセミカルバジド、アルデヒド、ケトン、第1級アルコール、第2級アルコール、第3級アルコール、フェノール、アルキルハロゲン化合物、チオール、ジスルフィド、第1級アミン、第2級アミン、第3級アミン、ヒドラジド、エポキシド、マレイミド、及び酸素原子、窒素原子及び／又はイオウ原子のような1又はそれより多くのヘテロ原子で任意に妨害された、又は停止され、任意で芳香族又はモノ／ポリ不飽和炭化水素を含有するC 1～C 20のアルキル基、ポリエチレングリコールのようなポリオキシエチレン、ポリ- $\beta$ -アラニン、ポリグリシン、ポリリジンのようなオリゴ／ポリアミド、ペプチド、オリゴ／多糖類、オリゴ／ポリリン酸塩、毒素、抗体、細胞毒、及びステロイド、並びに『親和性リガンド』、すなわち、特定のタンパク質、抗体、ポリ及びオリゴ糖、及びその他の生体分子上で特異的な親和性を有する官能基又は生体分子である。

### 【0058】

D N A挿入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート

基、リポーター基、及びリガンドの上述した具体例が、該当する基の『活性のある／官能的な』部分に相当することは当業者には明らかであろう。当業者にとって、DNA挿入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンドは、典型的には形態M-Kで表され、その際、Mは該当する基の『活性のある／官能的な』部分であり、Kはそれを介して『活性のある／官能的な』部分が5員環又は6員環に結合するスペーサーであることは更に明らかである。従って、BがDNA挿入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンドから選択される場合、B基は、形態M-Kを有し、その際、MはそれぞれDNA挿入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンドの『活性のある／官能的な』部分であり、Kは1~50の原子、好ましくは1~30の原子、特には1~15の原子を含む、5員環又は6員環と『活性のある／官能的な』部分との間の任意のスペーサーであることが理解されるべきである。

### 【0059】

ここで、用語『スペーサー』は、上記で定義した種類の2以上の異なった部分を繋ぐのに使用される熱化学的にも光化学的にも活性のない、間隔を空ける基を意味する。スペーサーは、疎水性、親水性、分子のたわみ性及び分子の長さを含む種々の特徴に基づいて選択される（例えば、Hermanson et al., "Immobilized Affinity Ligand Techniques" Academic Press, San Diego, California, 137~ff, 1992を参照のこと）。一般に、スペーサーの長さは400オングストローム未満であり、適用の中には100オングストローム未満が好ましい場合もある。従って、スペーサーは、酸素原子、窒素原子及び／又はイオウ原子のような1又はそれより多くのヘテロ原子で任意に妨害される又は停止される炭素原子の鎖を含む。従って、スペーサーKは、1又はそれより多くのアミド、エステル、アミノ、エーテル及び／又はチオエーテルの機能性を含んでもよく、任意で芳香族又はモノ／ポリ炭化水素、ポリエチレンジリコールのようなポリオキシエチレン、ポリ-β-アラニン、ポリグリシン、ポリリジンのようなオリゴ／ポリアミド、一般的なペプチド、オリゴ／多糖類、オリゴ／ポリリン酸塩を含んでもよい。

更に、スペーサーはそれらを組合せた単位から成ってもよい。スペーサーの長さは、5員環又は6員環に関して該当する基の『活性のある／官能的な』部分の所望の又は必要な位置及び空間的方向性を考慮して、変化してもよい。特に関心のある実施態様では、スペーサーは化学的に切断可能な基を包含する。かかる化学的に切断可能な基の例には、還元条件下で切断可能なジスルフィド結合、ペプチダーゼによって切断可能なペプチドなどが挙げられる。

#### 【0060】

1つの変形としては、Kは該当する基の『活性のある／官能的な』部分が5員環又は6員環と直接結合するような単結合を表す。

#### 【0061】

好ましい実施態様では、一般式I及びIIにおける置換基Bは、好ましくは核酸塩基、特にアデニン、グアニン、チミン、シトシン及びウラシルから選択される。

#### 【0062】

オリゴマー(式I)では、Pは続くモノマー又は5'末端基に対するヌクレオシド間結合のためのラジカル位を表す。該LNAが5'末端『モノマー』ではない場合、最初の可能性が適用されるが、該LNAが5'末端『モノマー』である場合、後者の可能性が適用される。かかるヌクレオシド間結合又は5'末端基は、置換基R5(又は同等に適用可能な：置換基R5\*)を包含してもよく、それによってP基に対して二重結合を形成してもよいことが理解されるべきである(以下のヌクレオシド間結合又は5'末端基の定義から更に明らかにすることができる)(5'末端はヌクレオシドにおけるリボース部分の5'炭素原子に相当する位置をいう)。

#### 【0063】

一方、先行するモノマー又は3'末端基(P\*)に対するヌクレオシド間結合は、置換基R3又はR3\*の1つによって定義される位置、好ましくは置換基R3\*によって定義される位置から始まる(3'末端はヌクレオシドにおけるリボース部分の3'炭素原子に相当する位置をいう)。

#### 【0064】

R 3 \* (『正規』の配置) 又は R 3 (キシロ配置) のどちらかとしての基 P \* の配向性は 2 つの同等に関心のある可能性を表すことが理解されるべきである。すべて『正規』の (R 3 \* = P \*) オリゴマー及び『正規』の L N A モノマーと ヌクレオチド (2-デオキシヌクレオチド及び／又はヌクレオチド) を組み合わせたオリゴマーは、D N A、R N A、及びその他の L N A オリゴマーに対して強く (高い親和性で) ハイブリッド形成することが見い出されている。全キシロ L N A オリゴマー及びオリゴマーとキシロ L N A (R 3 = P \*) モノマー及び例えばキシロヌクレオチド (ヌクレオチド及び／又は 2-デオキシヌクレオチド) との組み合わせは同等のハイブリッド形成特性を生じると現在考えられている。D N A、R N A、又はもう 1 つの L N A オリゴマーのいずれかとハイブリッド形成する (高い親和性で) する場合、『正規』配置の (R 3 \* = P \*) のオリゴマーは、反平行方向の L N A オリゴマーを生じることが明らかにされている。従って、キシロ (R 3 = P \*) 配置のオリゴマーは、D N A、R N A、又はもう 1 つの L N A オリゴマーに対してハイブリッド形成する場合、平行方向性を生じることが熟考される。

#### 【0065】

上記の観点では、1 つのオリゴマーにおける『正規』の L N A 及びキシロ L N A の組合せは、このように違った種類のモノマーがドメインに位置する限り、すなわち、少なくとも 5、例えば少なくとも 10 のモノマー (例えばキシロー L N A、キシローヌクレオチドなどのモノマー) の連続したドメインに、少なくとも 5、例えば少なくとも 10 の他の種類のモノマー (例えば『正規』の L N A、『正規』のヌクレオチドなど) の連続したドメインが続くように位置する限り、興味深い特性を生じることができる。例えば、核酸を捕捉するためにかかるキメラ型のオリゴマーを使用してもよい。

#### 【0066】

ここで、用語『モノマー』は、L N A と同様に、天然に生じるヌクレオシド、非天然に生じるヌクレオシド、P N A などに関する。従って、『続くモノマー』は、5' 末端方向で隣接するモノマーに関し、『先行するモノマー』は 3' 末端方向で隣接するモノマーに関する。L N A モノマーから見られるかかる続くモノ

マー及び先行するモノマーは天然に生じるヌクレオシドであっても、非天然に生じるヌクレオシドであっても、さらにLNAモノマーであってもよい。

### 【0067】

その結果、ここでは（上記の定義から派生することができるよう）用語『オリゴマー』は、1又はそれ以上のLNAの組み入れによって改変されたオリゴヌクレオチドを意味する。

### 【0068】

ここで、バイラジカル (biradical : R<sub>2</sub>\* - R<sub>4</sub>\*) の配向性は、左手側が最も低い数による置換基を表し、且つ右手側が最も高い数による置換基を表すようであり、従って、R<sub>2</sub>\*及びR<sub>4</sub>\*が共にバイラジカル『-O-CH<sub>2</sub>-』を表す場合、酸素原子がR<sub>2</sub>\*を表し、従って酸素原子が、例えばR<sub>2</sub>\*の位置に結合し、且つメチレン基がR<sub>4</sub>\*を表すと理解される。

### 【0069】

オリゴマーに組み入れられたLNAにおけるバイラジカル (R<sub>2</sub>\* - R<sub>4</sub>\*) の構造に関する多数の興味深い可能性を考慮すると、バイラジカルは好ましくは-(CR\*R\*)r-Y-(CR\*R\*)s-、-(CR\*R\*)r-Y-(CR\*R\*)s-Y-、-Y-(CR\*R\*)r-Y-(CR\*R\*)s-、-(CR\*R\*)r+s- -Y-、-Y-Y-から選択され、その際、各Yは独立して、-O-、-S-、-Si(R\*)<sub>2</sub>-、-N(R\*)-、>C=O、-C(=O)-N(R\*)-、及び-N(R\*)-C(=O)-から選択され、その際R\*はそれぞれ独立して水素、ハロゲン、アジド、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、モノー又はジ(C1~6のアルキル)アミノ、任意で置換されたC1~6のアルコキシ、任意で置換されたC1~6のアルキル、DNA挿入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンドから選択され、及び/又は隣接する2つの（双子ではない）R\*は一緒に二重結合を表してもよく；且つ、r及びsは、r+sの合計が1~4であるという但し書きを付けて0~4である。好ましくは、関心のある置換は、バイラジカルが-Y-、-(CR\*R\*)r+s-、-(CR\*R\*)r-Y-(CR\*R\*)s-

、及び-Y-(C R \* R \*) r+s-Y-から選択され、その際、r及びsが、r+sの合計が1~4であるという但し書きを付けて0~3であるようなものである。

### 【0070】

特に関心のあるオリゴマーは、オリゴマーの少なくとも1つのLNAにおけるR2\*及びR4\*が一緒になって、-O-、-S-、-N(R\*)---(C R \* R \*) r+s+1-、- (C R \* R \*) r-O-(C R \* R \*) s-、- (C R \* R \*) r-S-(C R \* R \*) s-、- (C R \* R \*) r-N(R\*)-(C R \* R \*) s-、-O-(C R \* R \*) r+S-O-、-O-(C R \* R \*) r+s-S-、-N(R\*)-(C R \* R \*) r+s-O-、-S-(C R \* R \*) r+s-O-、-O-(C R \* R \*) r+s-N(R\*)-、-S-(C R \* R \*) r+s-S-、-N(R\*)-(C R \* R \*) r+s-N(R\*)-、-N(R\*)-(C R \* R \*) r+s-S-、及び-S-(C R \* R \*) r+s-N(R\*)-から選択されるバイラジカルを表すようなものである。

### 【0071】

1つのR\*が水素、ヒドロキシ、任意で置換されたC1~6のアルコキシ、任意で置換されたC1~6のアルキル、DNA插入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンドから選択され、残りの置換基R\*のいずれもが水素であることが更に好ましい。

### 【0072】

1つの好ましい変形では、少なくとも1つのLNAのバイラジカルにおける1つの基R\*は、DNA插入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンドから選択される（その際、後者の基は、置換基Bに対して定義されるようなスペーサーを包含してもよい）。

### 【0073】

好ましくは、存在するがP又はP\*に関与しない、LNAの置換基、R1\*、R2、R3、R3\*、R5、R5\*、R6、及びR6\*はそれぞれ独立して、水素、任意で置換されたC1~6のアルキル、任意で置換されたC2~6のアルケ

ニル、ヒドロキシ、C1～6のアルコキシ、C2～6のアルケニロキシ、カルボキシ、C1～6のアルコキシカルボニル、C1～6のアルキルカルボニル、ホルミル、アミノ、モノー及びジ(C1～6のアルキル)アミノ、カルバモイル、モノー及びジ(C1～6のアルキル)アミノカルボニル、C1～6のアルキルカルボニルアミノ、カルバミド、アジド、C1～6のアルカノイロキシ、スルホノ、スルファニル、C1～6のアルキルチオ、DNA挿入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンド、及びハロゲンから選択され、その際、2つの双子の置換基は一緒になってオキソを表してもよく、その際、存在するがバイラジカルに関与しない場合はRN\*は水素及びC1～4のアルキルから選択される。

#### 【0074】

LNAの好ましい変形では、Xは-O-、-S-、及び-NRNR\*-、特に-O-から選択され、且つ、存在するがP又はP\*に関与しない、LNAの置換基、R1\*、R2、R3、R3\*、R5、R5\*、R6、及びR6\*はそれぞれ記載なしの水素を表す。

#### 【0075】

一層更に好ましい変形では、XはOであり、R2は、水素、ヒドロキシ、及び任意で置換されたC1～6のアルコキシから選択され、R3及びR3\*の1つはP\*であり、もう1つは、水素であり、R1\*、R5、及びR5\*は、水素を表し、更に好ましくは、-O-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0～1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1～3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0～1</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1～3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0～1</sub>-N(RN)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>1～3</sub>-、及び-(CH<sub>2</sub>)<sub>2～4</sub>-から、特に-O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-、及び-N(RH)-CH<sub>2</sub>-を選択されるバイラジカル(R2\*-R4\*)を表す。一般に、今のところ得られている結果に関して、R2\*及びR4\*を構成するバイラジカルは、2つの炭素原子の架橋を形成する、即ち、バイラジカルはフラノース環(X=O)と共に5員環を形成することが好ましい。特に関心があるのは、式Iの組み入れられたLNAのR2\*及びR4\*が一緒になって、-O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-、及び-N(RN)-CH<sub>2</sub>-から選択されるバイラジカルを表し；XがOであり、Bがアデニン、グアニン、

チミン、シトシン及びウラシルから選択される核酸塩基であり；R 2が水素であり、R 3又はR 3\*の1つがP\*を表し、もう1つが水素を表し、R 1\*、R 3、R 5、及びR 5\*が水素を表すオリゴマーのようなものである。

#### 【0076】

このような実施態様では、オリゴマーに組み入れられたLNAの少なくとも1つがアデニン及びグアニンから選択される核酸塩基（置換基B）を包含することが更に好まれる。特に、そこに組み入れられたLNAを有するオリゴマーがチミン、ウラシル及びシトシンから選択される少なくとも1つの核酸塩基並びにアデニン及びグアニンから選択される少なくとも1つの核酸塩基を包含することが好まれる。LNAモノマーについては、核酸塩基がアデニン及びグアニンから選択されることが特に好まれる。

#### 【0077】

このような関心のある実施態様の範囲内で、オリゴヌクレオチドのあらゆるモノマーはLNAモノマーである。

#### 【0078】

一般式I（オリゴマーにおけるLNA）及びそれに関連する定義から明らかのように、置換基及び可能なバイラジカル、以下参照、に依存してオリゴマーに存在する1又は数個の非対称性の炭素原子があってもよい。

#### 【0079】

1つの変形では、R 3\*はP\*を表す。もう1つの変形ではR 3はP\*を表し、第3の変形では、オリゴマーの中で、R 3\*がP\*を表すLNAもあり、R 3がP\*を表すLNAもある。

#### 【0080】

オリゴマーは典型的には、一般式Iの1～10000のLNA及び天然に生じるヌクレオシド及びヌクレオシド類縁体から選択される0～10000のヌクレオシドを含む。ヌクレオシドの数とLNAの数の合計は、2～15000の範囲のような、好ましくは2～100の範囲のような、3～100特に2～50の範囲のような、3～50又は5～50又は7～50のような、少なくとも2、好ましくは少なくとも3、特に少なくとも5、特別には少なくとも7である。

**【0081】**

ここで、用語『ヌクレオシド』は複素環塩基のグリコシドを意味する。用語『ヌクレオシド』は非天然に生じるヌクレオシド、天然に生じるヌクレオシド及びその他のヌクレオシド類縁体を包含することについて広く用いられる。ヌクレオシドの例証的な例は、リボース部分を含むリボヌクレオシド及びデオキシリボース部分を含むデオキシリボヌクレオシドである。かかるヌクレオシドの塩基に関しては、これは、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、及びウラシルのような天然に生じる塩基のいかなるもの、及びそのいかなる変異体又はいかなる可能性のある非天然の塩基であってもよい。

**【0082】**

定義並びに既知のヌクレオシド（天然に生じる及び非天然に生じる）及びヌクレオシド類縁体（既知の二環式及び三環式類縁体を含む）を考慮する場合、オリゴマーが1又はそれより多くのLNA（置換基の選択に関して及びバイラジカルの選択に関しての双方で同一であっても、異なっていてもよい）及び1又はそれより多くのヌクレオシド及び／又はヌクレオシド類縁体を含んでもよいことは明らかである。ここで、『オリゴヌクレオチド』は、ヌクレオシド間結合を介して連結されるヌクレオシドの連続的な鎖を意味するが、オリゴマー（オリゴヌクレオチド）における1又はそれより多くのヌクレオチド単位（モノマー）の中で核酸塩基が上記で定義したように置換基Bによって改変されてもよいことが理解されるべきである。

**【0083】**

上述のように、オリゴマーのLNAはヌクレオシド間結合を介して他のモノマーに接続する。ここで、用語『ヌクレオシド間結合』は、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NRH-$ 、 $>C=O$ 、 $>C=NRH$ 、 $>C=S$ 、 $-Si(R'')$ 、 $-2-$ 、 $-SO-$ 、 $-S(O)2-$ 、 $-P(O)2-$ 、 $-PO(BH_3)-$ 、 $-P(O,S)-$ 、 $-P(S)2-$ 、 $-PO(R'')-$ 、 $-PO(OCH_3)-$ 、及び $-PO(NHRH)-$ から選択される、2～4；好ましくは3つの基／原子から成る結合を意味し、その際、RHは、水素及びC1～4のアルキルから選択され、R''はC1～6のアルキル及びフェニルから選択される。かかるヌ

クレオシド間結合の例証的な例は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CO-CH_2-$ 、 $-CH_2-CHOH-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CH=$  (続くモノマーへの結合として使用される場合R5も含む)、 $-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-NRH-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-NRH-$ 、 $-CH_2-NRH-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-NRH-$ 、 $-NRH-CO-O-$ 、 $-NRH-CO-NRH-$ 、 $-NRH-CS-NRH-$ 、 $-NRH-C (=NRH)-NRH-$ 、 $-NRH-CO-CH_2-NRH-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-O-CO-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CO-O-$ 、 $-CH_2-CO-NRH-$ 、 $-O-CO-NRH-$ 、 $-NRH-CO-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CO-NRH-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-NRH-$ 、 $-CH=N-O-$ 、 $-CH_2-NRH-O-$ 、 $-CH_2-O-NRH-$ 、 $-CO-NRH-CH_2-$ 、 $-CH_2-NRH-O-$ 、 $-CH_2-NRH-CO-$ 、 $-O-NRH-CH_2-$ 、 $-O-NRH-$ 、 $-O-CH_2-S-$ 、 $-S-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-S-CH_2-CH=$  (続くモノマーへの結合として使用される場合R5も含む)、 $-S-CH_2-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-S-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-S-CH_2-$ 、 $-CH_2-SO-CH_2-$ 、 $-CH_2-SO_2-CH_2-$ 、 $-O-SO-O-$ 、 $-O-S(O)2-O-$ 、 $-O-S(O)2-CH_2-$ 、 $-O-S(O)2-NRH-$ 、 $-NRH-S(O)2-CH_2-$ 、 $-O-S(O)2-CH_2-$ 、 $-O-P(O)2-O-$ 、 $-O-P(O, S)-O-$ 、 $-O-P(S)2-O-$ 、 $-S-P(O)2-O-$ 、 $-S-P(O, S)-O-$ 、 $-S-P(S)2-O-$ 、 $-O-P(O)2-S-$ 、 $-O-P(O, S)-S-$ 、 $-O-P(S)2-S-$ 、 $-S-P(O)2-S-$ 、 $-S-P(O, S)-S-$ 、 $-S-P(S)2-S-$ 、 $-O-PO(R'')-O-$ 、 $-O-PO(OC$   
 $H_3)-O-$ 、 $-O-PO(OCH_2CH_3)-O-$ 、 $-O-PO(OCH_2$   
 $OCH_2S-R)-O-$ 、 $-O-PO(BH_3)-O-$ 、 $-O-PO(NH$   
 $RN)-O-$ 、 $-O-P(O)2-NRH-$ 、 $-NRH-P(O)2-O-$

、 $-O-P(O, NRH)-O-$ 、 $-CH_2-P(O)2-O-$ 、 $-O-P(O)2-CH_2-$ 、及び $-O-Si(R'')2-O-$ であり、中でも、 $-CH_2-CO-NRH-$ 、 $-CH_2-NRH-O-$ 、 $-S-CH_2-O-$ 、 $-O-P(O)2-O-$ 、 $-O-P(O, S)-O-$ 、 $-O-P(S)2-O-$ 、 $-NRH-P(O)2-O-$ 、 $-O-P(O, NRH)-O-$ 、 $-O-P(O, R'')-O-$ 、 $-O-PO(CH_3)-O-$ 、及び $-O-PO(NHRN)-O-$ が、特に好ましく、その際、RHは水素及びC1～4のアルキルから選択され、R''はC1～6のアルキル及びフェニルから選択される。更に例証的な例は、Mesmaekerら(“Current Opinion in Structural Biology” 5:343-355, 1995)によって与えられている。ヌクレオシド結合の左手側は置換基P\*としての5員環に結合し、右手側は先行するモノマーの5'位に結合する。

#### 【0084】

該LNAが5'末端モノマーである場合、P基が5'末端基も表してよいことは上記からも明らかである。かかる5'末端基の例は、水素、ヒドロキシ、任意で置換されたC1～6のアルキル、任意で置換されたC1～6のアルコキシ、任意で置換されたC1～6のアルキルカルボニロキシ、任意で置換されたアリーロキシ、モノリン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、及び-W-A'であり、その際、Wは-O-、-S-、及び-N(RH)-から選択され、その際RHは、水素、及びC1～6のアルキルから選択され、A'は、DNA挿入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンドから選択される（その際、後者の基は置換基Bに対して定義されるようなスペーサーを包含してもよい）。

#### 【0085】

本記載及びクレームでは、用語『一リン酸塩』、『二リン酸塩』及び『三リン酸塩』は、それぞれ、式 $-O-P(O)2-O-$ 、 $-O-P(O)2-OP(O)2-O-$ 、及び $-O-P(O)2-O-P(O)2-O-P(O)2-O-$ の基を意味する。

#### 【0086】

特に関心のある実施態様では、P基は、一リン酸塩、二リン酸塩及び三リン酸

塩から選択される5'末端基を表す。特に三リン酸塩の変異体は、核酸ポリメラーゼに対する基質として興味深い。

### 【0087】

類似的に、P\*基は該LNAが3'末端モノマーである場合3'末端基を表してもよい。かかる3'末端基の例は、水素、ヒドロキシ、任意で置換されたC1~6のアルコキシ、任意で置換されたC1~6のアルキルカルボニロキシ、任意で置換されたアリーロキシ及び-W-A'であり、その際、Wは-O-、-S-、及び-N(RH)ーから選択され、その際RHは、水素、及びC1~6のアルキルから選択され、A'は、DNA挿入剤、光化学的に活性のある基、熱化学的に活性のある基、キレート基、リポーター基、及びリガンドから選択される（その際、後者の基は置換基Bに対して定義されるようなスペーサーを含してもよい）。

### 【0088】

LNAの好ましい変形では、オリゴマーは以下の式Vを有する：

$$G - [Nu-L]_n(o) - \{ [LNA-L]_m(q) - [Nu-L]_n(q) \}_q - G^* V$$

(式中、n(0)~n(q)とm(1)~m(q)の合計が2~15000であるという但書き付きで、qは1~50であり；n(0)~n(q)のそれぞれは独立して0~10000であり；m(1)~m(q)のそれぞれは独立して1~10000であり；

Gは5'末端基を表し；

Nuはそれぞれ独立して天然に生じるヌクレオシド及びヌクレオシド類縁体から選択され；LNAはそれぞれ独立してヌクレオシド類縁体を表し；Lはそれぞれ独立してNu及びLNAから選択される2つの基の間のヌクレオシド間結合を表し、又はG\*と一緒にになって3'末端基を表し；及び

LNA-Lはそれぞれ独立して上記と同義の式Iのヌクレオシド類縁体を表す。

### 【0089】

本変形の範囲内で、一般にと同様に、LNAは好ましくは、異なった核酸塩基、特に、チミン、シトシン及びウラシルから選択される核酸塩基並びにアデニン

及びゲアニンから選択される核酸塩基の双方を包含する。

### 【0090】

オリゴマーはキメラ型オリゴマーも網羅することが意図される。用語『キメラ型オリゴマー』は、直接又はスペーサーを介して接続される異なった起源のモノマーを伴った2つ以上のオリゴマーを意味する。組合せができるかかるオリゴマーの例証的な例は、ペプチド、PNAオリゴマー、LNAを含有するオリゴマー及びオリゴヌクレオチドオリゴマーである。種々のドメインが様々な親和性及び特異性の特性を有してもよいようなキメラ型オリゴマーの例として、キシロLNA ( $R_3 = P^*$ ) LNAドメイン及び『正規』のLNA ( $R_3^* = P^*$ ) ドメインを有するオリゴマーの組合せが構築されてもよい。

### 【0091】

一般に、オリゴマーは親和性及び特異性に関して驚くべき良好なハイブリッド形成特性を有する。従ってオリゴマーは、いかなるヌクレオシド類縁体も含まない相当する改変されていない対照オリゴヌクレオチドの $T_m$  よりも少なくとも2.5°C高い、好ましくは少なくとも3.5°C高い、特に少なくとも4.0°C高い、特別には少なくとも5.0°C高い $T_m$  を相補的なDNAオリゴヌクレオチドと共にオリゴマーに与える少なくとも1つのヌクレオシド類縁体を含む。特に、Nがヌクレオシド類縁体の数である場合、オリゴマーの $T_m$  は、少なくとも $2.5 \times N$ °C高く、好ましくは少なくとも $3.5 \times N$ °C高く、特に少なくとも $4.0 \times N$ °C高く、特別には少なくとも $5.0 \times N$ °C高い。

### 【0092】

相補的なRNAオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成の場合、少なくとも1つのヌクレオシド類縁体が、いかなるヌクレオシド類縁体も含まない相当する改変されていない対照オリゴヌクレオチドの $T_m$  よりも少なくとも4.0°C高い、好ましくは少なくとも5.0°C高い、特に少なくとも6.0°C高い、特別には少なくとも7.0°C高い $T_m$  を相補的なDNAオリゴヌクレオチドと共にオリゴマーに与える。特に、Nがヌクレオシド類縁体の数である場合、オリゴマーの $T_m$  は、少なくとも $4.0 \times N$ °C高く、好ましくは少なくとも $5.0 \times N$ °C高く、特に少なくとも $6.0 \times N$ °C高く、特別には少なくとも $7.0 \times N$ °C高い。

## 【0093】

用語『相当する改変されていない対照オリゴヌクレオチド』は、同一の絶対順(及び同一方向)において同一の核酸塩基を表す単に天然に生じるヌクレオチドだけから成るオリゴヌクレオチドを意味することを意図する。

## 【0094】

$T_m$  は以下の条件の1つのもとで、好ましくは、等モル量(典型的には1. 0  $\mu M$ )のオリゴマーと相補的なDNAオリゴヌクレオチドで条件a)のもとで測定される:

- a) 10 mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pHは7. 0、100 mMのNaCl、0. 1 mMのEDTA;
- b) 10 mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pHは7. 0、0. 1 mMのEDTA; 又は
- c) 3 Mのテトラメチル塩化アンモニウム(TMAC)、10 mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pHは7. 0、0. 1 mMのEDTA。

## 【0095】

オリゴマーは好ましくは上記と同義であり、その際、少なくとも1つのヌクレオシド類縁体は、Bが核酸塩基である式Iを有する。特に関心があるのは、少なくとも1つのヌクレオシド類縁体がアデニン及びグアニンから選択される核酸塩基を包含する場合である。

## 【0096】

更に特異性及び親和性に関してオリゴマーは、1又はそれより多くの前記オリゴマーとのミスマッチを有する、部分的に相補的なDNAオリゴヌクレオチド又は部分的に相補的なRNAオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成する場合、前記ミスマッチの結果として、いかなるヌクレオシド類縁体も含まない相当する改変されていない対照オリゴヌクレオチドで観察される低下と同等又はそれより大きな $T_m$ の低下を示す。また、オリゴマーは、相当する改変されていない対照オリゴヌクレオチドのそれと実質的に同一の、ハイブリッド形成用緩衝液のイオン強度に対する $T_m$ の感度を有するべきである。

## 【0097】

本明細書で定義されるオリゴマーは典型的には、少なくとも1%改変され、例

えば、少なくとも2%改変され、例えば3%改変され、4%改変され、5%改変され、6%改変され、7%改変され、8%改変され、又は9%改変され、少なくとも10%改変され、例えば、少なくとも11%改変され、例えば12%改変され、13%改変され、14%改変され、又は15%改変され、少なくとも20%改変され、例えば少なくとも30%改変され、少なくとも50%改変され、例えば70%改変され、関心のある適用では100%改変されることもある。

### 【0098】

オリゴマーは好ましくは、相当する改変されていない対照オリゴヌクレオチドよりも高い3'内ヌクレオチド結合分解性の安定性を有する。

### 【0099】

オリゴマー（LNAが組み入れられている）及びLNAそれ自体は、薬事上許容可能な塩が特に関連する、その可能性のある塩を包含することが理解されるべきである。塩は酸付加塩及び塩基性塩を包含する。酸付加塩の例は、塩酸塩、ナトリウム塩、カルシウム塩、カリウム塩などである。塩基性塩の例は、（残りの）対イオンがナトリウム及びカリウムのようなアルカリ金属、カルシウム及びアンモニウムのようなアルカリ土類金属、イオン（R<sub>g</sub>及びR<sub>h</sub>がそれぞれ独立して、任意で置換されたC<sub>1</sub>～6のアルキル、任意で置換されたC<sub>2</sub>～6のアルケニル、任意で置換されたアリール又は任意で置換されたヘテロアリールである+N（R<sub>g</sub>）3R<sub>h</sub>）から選択される塩である。薬事上許容可能な塩は、例えば、RemingtonのPharmaceutical Science (17 Ed., Alfonso R. Gennaro (Ed) Mack Publishing Company, Eaton, PA, USA, 1985) 及びEncyclopedia of Pharmaceutical Technologyの最近の版に記載されているようなものである。従って、本明細書で使用されるとき、用語『その酸付加塩又は塩基性塩』は、かかる塩を含むことを意図する。更に、オリゴマー及びLNA及びいかなる中間体又は出発物質も水和物の形態で存在してもよい。

### 【0100】

#### 【実施例】

(実施例 1)

リン酸緩衝液中でG n H C 1は、L N Aのハイブリッド形成を行い、それを高める。

塩酸グアニジン（G n H C 1）のような強力なカオトロピック剤がハイブリッド形成で発揮する効果を調べるために、以下の実験を行った。

5'アントラキノンを持つL N A改変オリゴ（表1を参照のこと）をUV照射によって微量力価プレートのウエルに共有結合で固相化し、相補的な標的D N Aオリゴとのハイブリッド形成アッセイにおいて捕捉用プローブとして用いた。ハイブリッド形成混合物において5'ビオチン化D N A検出用プローブを包含することによってハイブリッドを検出した。

### 【0101】

【表1】

オリゴヌクレオチドの実験

名称	E Q番号	配列番号	配 列	特 徵
C8	EQ-3133	4	5'-AQ-tac atg tta tgc tt GAC <sup>met</sup> <u>C<sup>met</sup></u> GT GTg-3'	L N A修飾 5'アントラキノン
C11	EQ-3131	5	5'-AQ-tac atg tta tgc tt AAG AC <sup>met</sup> <u>C<sup>met</sup></u> GTG TGc-3'	L N A修飾 5'アントラキノン
HEG C8	EQ-3108	6	5'-AQ-HEG-AGA C <sup>met</sup> CG TGT-3'	5'ヘキシレングリコール L N A
野生型 ターゲット 分子	EQ3185	7	5'ttg aat tcc aag agc aca cgg tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	野生型 sense g/c pos. 9756 (50-mer)
検出プローブ	EQ-3246	8	5'-biotin-ttg gaa gtg ccc tgc agc tt-3'	5'ビオチン化D N A

### 【0102】

表1は、調べたオリゴヌクレオチドに関するものである。

注： L N Aモノマーを大文字で示し、D N Aモノマーを小文字で示す。C m e tはモノマーが5-メチルシトシンL N Aであることを示す。5' A Qは、オリゴが5'アントラキノン及びC 3リンカーを持ち、組成物がA Q-C O N H-（

CH<sub>2</sub>) 3-オリゴであることを示す。5' -AQ-HEGは、オリゴの5' 末端がAQ-CO NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>-((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O)<sub>5</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-オリゴであることを示す。5' -ビオチンは、オリゴの5' 末端がビオチニー(=CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-オリゴであることを示す。

#### 【0103】

##### A p o B捕捉用プローブの固相化

濃度0. 1 μMの0. 2MのNaCl中にアントラキノンLNA捕捉用プローブ(C8、C11又はHEG C8のいずれか、表1を参照のこと)を溶解した。100 μLのオリゴを微量力価プレート(C96、ポリソープ；デンマーク、ロスキルド、ナルジ・ヌンク・インターナショナル)の各ウエルに加え、最大35 °CにてULS-20-2照射器(UVライト；システムズ；デンマーク)における軟UV光(約350 nm)に15分間暴露した。28個のフィリップス・クレオ小型25W-S電球(ガラス板の試料保持板の上に14個及び下に14個)とともに照射器を配置し、上方の電球のみに明かりをつけた。

#### 【0104】

インキュベートの後、300 μLの0. 25%ツイーン20(ドイツ、Seelze Riedel-de Haen)入りの0. 4MのNaOHにてまずウエルを洗浄し、次いで300 μLの脱イオン水にて3回洗浄した。

#### 【0105】

##### 標的と検出用プローブのハイブリッド形成

C8、C11又はHEG C8補足用プロローグのいずれかでコートした微量力価プレートのウエルに野生型(WT)の標的分子(0. 3 μMのEQ3185、SEQ ID NO 7)を加えた。ハイブリッド形成混合物におけるGnHC1の濃度は以下に記載するように2倍『希釈』で変化させた。GnHC1の得られた濃度は、0. 0078、0. 016、0. 032、0. 063、0. 13、0. 25、0. 5、1、2、4、及び8Mであった。

#### 【0106】

8Mの最終濃度で固体のGnHC1を0. 1%のツイーン20と共に50 mM

のリン酸緩衝液に溶解することによりハイブリッド形成用緩衝液を構築した。0 MのGnHC1を含有する同様の緩衝液によって8MのGnHC1を含有する緩衝液を希釈することによって更に低い濃度のGnHC1緩衝液を構築した。

### 【0107】

微量力価プレートのウエル当り100 $\mu$ Lのハイブリッド形成混合物を加えた。37°Cにて捕捉用オリゴと標的オリゴを30分間ハイブリッド形成させた。次いで、0.1%ツイーン20の入った300 $\mu$ Lの1xSSC(1xSSCは150mMのNaCl、15mMのクエン酸ナトリウム)にてウエルを5回洗浄した。次いで0.1%ツイーン20の入った1xSSCに溶解した100 $\mu$ Lの0.12 $\mu$ Mの検出用プローブ(EQ-3246、SEQ ID NO 8)を加え、37°Cにて30分間ハイブリッド形成させた。最後に0.1%ツイーン20の入った1xSSCにて微量力価プレートを3回洗浄した。

### 【0108】

ビオチン化した検出用プローブにストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(streptavidin-HRP)を結合することによりハイブリッドを検出した。0.1%ツイーン20入りの1xSSCに1 $\mu$ g/mLの濃度でstreptavidin-HRP(米国、イリノイ州、ロックフォード、ピアース、カタログ番号21126)を溶解した。ウエル当り100 $\mu$ L加え、15分間インキュベートした。次いで1xSSC; 0.1%ツイーン20でプレートを3回洗浄し、OPDアッセイにてシグナルを発色させた。

### 【0109】

#### OPDアッセイ

6mLの0.1Mクエン酸緩衝液、pH=5.0、2mgのオルソーフェニレンジアミン(OPD)の錠剤を2錠(デンマーク、コペンハーゲン、ケムーエン-テック)及び2.5 $\mu$ Lの30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含有する主要混合物を調製した。100 $\mu$ Lの主要混合物を各反応槽に加え、酵素活性に応じて1~30分間インキュベートする。100 $\mu$ Lの0.5MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>によってアッセイを停止し、ELISA読み取り装置により $\lambda=492\text{nm}$ にて光学密度を測定する。

結果を図1に示す。

## 【0110】

## 結論

実験から、GnHC1を含有する緩衝液において良好な効率にてハイブリッド形成することが可能であると結論付けられる。驚くべきことに、GnHC1の濃度が増すにつれてハイブリッド形成のシグナルが高まることが観察される。極めて高い(8M)GnHC1濃度でさえ、高いハイブリッド形成シグナルが得られる。実際、DNAリンカー(C8(EQ-、SEQ ID NO 4)及びC11(EQ-3131、SEQ ID NO 5))を伴った捕捉用オリゴの場合、約0.1Mでその効果が始まり、ハイブリッド形成シグナルを約30%高める約0.5M~5Mの最適値を有するGnHC1の関数としてハイブリッド形成シグナルは増加する。ヘキサエチレングリコールのリンカー(HEGC8(EQ-3108、SEQ ID NO 6))を介して微量力価プレートの表面に固相化された捕捉用プローブへのハイブリッド形成はあまり影響を及ぼさないと思われる。

## 【0111】

## (実施例 2)

GnHC1におけるハイブリッド形成は特異的である(競合実験)

塩酸グアニジン(GnHC1)のような強力なカオトロピック剤を含有する緩衝液におけるハイブリッド形成が单一塩基を区別できるような十分に高い厳密性で行うことができるかどうか調べるために、以下の実験を行った。

5'アントラキノンを持つDNA改変オリゴ(表2を参照のこと)をUV照射によって微量力価プレートのウエルに共有結合で固相化し、相補的な標的DNAオリゴとのハイブリッド形成アッセイにおいて捕捉用プローブとして用いた。ハイブリッド形成混合物において5'ビオチン化DNA検出用プローブを包含することによってハイブリッドを検出した。

## 【0112】

## 【表2】

## オリゴヌクレオチドの実験

名称	E Q番号	配列番号	特 徴	配 列
C8	EQ-3133	4	5'-AQ-tac atg tta tgc tt GAC <sup>met</sup> <u>C<sup>met</sup></u> GT GTg-3'	L N A修飾 5' アントラキノン
T8	EQ-3134	9	5'-AQ-tac atg tta tgc tt GAC <sup>met</sup> <u>I</u> GT GTg-3'	L N A修飾 5' アントラキノン
野生型 ターゲット 分子	EQ3185	7	5'ttg aat tcc aag agc aca cgg tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	野生型 sense g/c pos. 9756 (50-mer)
変異型 ターゲット 分子	EQ3187	10	5'ttg aat tcc aag agc aca cag tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	Sense a/t pos. 9756 (50-mer)
検出プローブ	EQ-3246	8	5'-biotin-ttg gaa gtg ccc tgc agc tt-3'	5' ピオチン化D N A

## 【0113】

表2は、調べたオリゴヌクレオチドに関する。

注： L N Aモノマーを大文字で示し、 D N Aモノマーを小文字で示す。 C m e tはモノマーが5-メチルシトシンL N Aであることを示す。 5' A Qは、オリゴが5' アントラキノン及びC 3リンカーを持ち、組成物がA Q-C O N H-(C H 2) 3-オリゴであることを示す。 5' -ビオチンは、オリゴの5' 末端がビオチニ-(C H 2) 4-C O N H-(C H 2) 6-オリゴであることを示す。

## 【0114】

## A p o B捕捉用プローブの固相化

濃度0. 1  $\mu$  Mの0. 2 MのN a C 1中にアントラキノンL N A捕捉用プローブ(C 8又はT 8のいずれか、表2を参照のこと)を溶解した。 1 0 0  $\mu$  Lのオリゴを微量力価プレート(C 9 6、ポリソープ；デンマーク、ロスキルド、ナルジ・ヌンク・インターナショナル)の各ウエルに加え、最大3 5 °CにてU L S-20-2照射器(U Vライトシステムズ；デンマーク)における軟U V光(約3 5 0 n m)に1 5分間暴露した。 2 8個のフィリップス・クレオ小型2 5 W-S

電球（ガラス板の試料保持板の上に14個及び下に14個）とともに照射器を配置し、上方の電球のみに明かりをつけた。

#### 【0115】

インキュベートの後、 $300\mu\text{L}$ の0.25%ツイーン20（ドイツ、Seelze Riedel-de Haen）入りの0.4MのNaOHにてまずウエルを洗浄し、次いで $300\mu\text{L}$ の脱イオン水にて3回洗浄した。

#### 【0116】

野生型標的分子（EQ-3185）及び変異型標的分子（EQ-3187）とのハイブリッド形成

C8捕捉用プローブ（EQ-3133、SEQ ID NO 4）でコートしたウエルに野生型標的分子（EQ-3185、SEQ ID NO 7）を低い一定の濃度（0.0005 μM）で加え、一方、競合する单一塩基ミスマッチ変異型標的分子（EQ-3187、SEQ ID NO 10）の量は5倍『連続希釈』で変化させた。変異型標的分子の得られた濃度は、0.0001、0.0005、0.0025、0.012、0.06、及び $0.30\mu\text{M}$ であった。

#### 【0117】

T8捕捉用プローブ（EQ-3134、SEQ ID NO 9）をコートしたチャンバーに、変異型標的分子を低い一定の濃度（0.005 μM）で加え、一方、競合する单一塩基ミスマッチ野生型標的分子（EQ-3185、SEQ ID NO 7）の量は5倍『連続希釈』で変化させた。野生型標的分子の得られた濃度は、0.0001、0.0005、0.0025、0.012、0.06、及び $0.30\mu\text{M}$ であった。

#### 【0118】

8Mの最終濃度で固体のGnHC1を0.1%のツイーン20と共に50mMのリン酸緩衝液に溶解することによりハイブリッド形成用緩衝液を構築した。0MのGnHC1を含有する同様の緩衝液によって8MのGnHC1を含有する緩衝液を希釈することによって更に低い濃度のGnHC1緩衝液を構築した。

#### 【0119】

微量力価プレートのウエル当り  $100\ \mu L$  のハイブリッド形成混合物を加えた。37°Cにて捕捉用オリゴと標的オリゴを30分間ハイブリッド形成させた。次いで、0.1%ツイーン20の入った $300\ \mu L$ の1×SSC（1×SSCは150mMのNaCl、15mMのクエン酸ナトリウム）にてウエルを5回洗浄した。次いで0.1%ツイーン20の入った1×SSCに溶解した $100\ \mu L$ の0.12μMの検出用プローブ（EQ-3246、SEQ ID NO 8）を加え、37°Cにて30分間ハイブリッド形成させた。最後に0.1%ツイーン20の入った1×SSCにて微量力価プレートを3回洗浄した。

### 【0120】

ビオチン化した検出用プローブにストレプトアビジンー西洋ワサビペルオキシダーゼ（streA-HRP）を結合することによりハイブリッドを検出した。0.1%ツイーン20入りの1×SSCに $1\ \mu g/mL$ の濃度でstreA-HRP（米国、イリノイ州、ロックフォード、ピアース、カタログ番号21126）を溶解した。ウエル当り $100\ \mu L$ 加え、15分間インキュベートした。次いで1×SSC；0.1%ツイーン20でプレートを3回洗浄し、OPDアッセイにてシグナルを発色させた。

### 【0121】

#### OPDアッセイ

6mLの0.1Mクエン酸緩衝液、pH=5.0、2mgのオルソフェニレンジアミン（OPD）の錠剤を2錠（デンマーク、コペンハーゲン、ケムーエン-テック）及び $2.5\ \mu L$ の30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含有する主要混合物を調製した。 $100\ \mu L$ の主要混合物を各反応槽に加え、酵素活性に応じて1~30分間インキュベートする。 $100\ \mu L$ の0.5MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>によってアッセイを停止し、ELISA読み取り装置によりλ=492nmにて光学密度を測定する。

結果を図3及び図4に示す。

### 【0122】

#### 結論

この実験に基づいて、ハイブリッド形成の厳密性は、高濃度のGnHC1においてさえ、GnHC1を含まない緩衝液で認められる厳密性と同等であると結論

付けられる。

### 【0123】

競合する変異型標的分子の濃度が $0.05\mu M$ を超えるまで、C8捕捉用プローブと共に、(非特異的な)シグナルにおける明瞭な上昇は見られない。この濃度ではマッチしたオリゴとミスマッチのオリゴの濃度比は1:100である。GnHC1の濃度に依存して $0.2\sim0.5\mu M$ の競合オリゴの量で、マッチしたオリゴとミスマッチのオリゴからの同等の寄与(例えば、シグナルにおける2倍の増加)が得られている。4MまでのGnHC1の濃度で高い厳密性が見られる。このような緩衝液では、約1:600のマッチしたオリゴとミスマッチのオリゴの比で同等のシグナルが得られる。言い換えれば、1:600のシグナルとノイズの比が認められる。

### 【0124】

競合する野生型標的分子の濃度が $0.1\mu M$ を超えるまで、T8捕捉用プローブと共に、(非特異的な)シグナルにおける明瞭な上昇は見られない。この濃度ではマッチしたオリゴとミスマッチのオリゴの濃度比は1:20である。競合するオリゴのいかなる量においてもマッチしたオリゴとミスマッチのオリゴからの同等の寄与(例えば、シグナルにおける2倍の増加)は得られない。従って、同等のシグナルは、1:60よりも高いマッチしたオリゴとミスマッチのオリゴの比で得られると思われる。言い換えれば、シグナルとノイズの比は、1:60よりも高い(1:100の推定値より超える)ことが認められる。

### 【0125】

塩酸グアニジン(GnHC1)のような強力なカオトロピック剤を含有する緩衝液におけるハイブリッド形成が单一塩基を区別できるような十分に高い厳密性で行うことができると結論付けられる。

### 【0126】

#### (実施例 3)

GnSCNはクエン酸ナトリウム緩衝液及びリン酸緩衝液中でハイブリッド形成を行うことができ、それを高めることができる。

RNA調製物に対する標準的な溶解緩衝液は、クエン酸ナトリウム緩衝液に基

づくことが多い。例えば、Gillsin (Biochemistry 13:2633, 1974) 及びChirwinn (Biochemistry 18:5294, 1979)。クエン酸ナトリウム又はリン酸のどちらかに基づいたグアニジンチオシアネート (GnSCN) 含有緩衝液におけるハイブリッド形成能を比較するために以下の実験を行った。

### 【0127】

5'アントラキノンを持つLNA改変オリゴ(表3-1を参照のこと)をUV照射によって微量力価プレートのウェルに共有結合で固相化し、相補的な標的DNAオリゴとのハイブリッド形成アッセイにおいて捕捉用プローブとして用いた。ハイブリッド形成混合物において5'ビオチン化DNA検出用プローブを包含することによってハイブリッドを検出した。

### 【0128】

【表3】

#### オリゴヌクレオチドの実験

名称	EQ番号	配列番号	配列	特徴
C8	EQ-3133	4	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> C <sup>met</sup> GT GTg-3'	LNA修飾 5'アントラキノン
T8	EQ-3134	9	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> TGT GTg-3'	LNA修飾 5'アントラキノン
野生型 ターゲット 分子	EQ3185	7	5'ttg aat tcc aag agc aca cgg tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	野生型 sense g/c pos. 9756 (50-mer)
変異型 ターゲット 分子	EQ3187	10	5'ttg aat tcc aag agc aca cag tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	Sense a/t pos. 9756 (50-mer)
検出プローブ	EQ-3246	8	5'-biotin-itg gaa gtg ccc tgc agc tt-3'	5'ビオチン化DNA

### 【0129】

表3は、調べたオリゴヌクレオチドに関する。

注： LNAモノマーを大文字で示し、DNAモノマーを小文字で示す。Cme

tはモノマーが5-メチルシトシンLNAであることを示す。5' A Qは、オリゴが5'アントラキノン及びC3リンクーを持ち、組成物がA Q-C O N H-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-オリゴであることを示す。5'-ビオチンは、オリゴの5'末端がビオチン-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C O N H-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-オリゴであることを示す。

### 【0130】

#### A p o B捕捉用プローブの固相化

濃度0.1 μMの0.2MのNaCl中にアントラキノンLNA捕捉用プローブ(C8又はT8のいずれか、表3を参照のこと)を溶解した。100 μLのオリゴを微量力値プレート(C96、ポリソープ；デンマーク、ロスキルド、ナルジ・ヌンク・インターナショナル)の各ウエルに加え、最大35°CにてULS-20-2照射器(UVライトシステムズ；デンマーク)における軟UV光(約350 nm)に15分間暴露した。28個のフィリップス・クレオ小型25W-S電球(ガラスの試料保持板の上に14個及び下に14個)とともに照射器を配置し、上方の電球のみに明かりをつけた。

### 【0131】

インキュベートの後、300 μLの0.25%ツイーン20(ドイツ、Seelze Riedel-de Haen)入りの0.4MのNaOHにてまずウエルを洗浄し、次いで300 μLの脱イオン水にて3回洗浄した。

### 【0132】

WT(EQ-3185)標的分子及びMUT(EQ-3187)標的分子とのハイブリッド形成

C8捕捉用プローブをコートした微量力値プレートのウエルに野生型(WT)標的分子(0.012 μM)を加えた。ハイブリッド形成混合物中のGnSCNの濃度は以下に示すように2倍『希釈』で変化させた。得られたGnSCNの濃度は0.03、0.06、0.13、0.25、0.5、1、2及び4Mであった。

### 【0133】

同様に、T8捕捉用プローブをコートした微量力値プレートに変異型(MUT)

) 標的分子 (0. 012 μM) を加え、0. 03、0. 06、0. 13、0. 25、0. 5、1、2及び4MのGnSCNにてハイブリッド形成させた。

#### 【0134】

0. 5%サルコシル入りの40mMのクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH7) 又は0. 1%ツイーン20入りの50mMのリン酸緩衝液 (pH7) のどちらかに最終濃度4Mの固体GnSCNを溶解することによってハイブリッド形成用緩衝液を構築した。0MのGnSCNを含有する同様の緩衝液によって4MのGnSCNを含有する緩衝液を希釈することによって更に低い濃度のGnSCN緩衝液を構築した。

#### 【0135】

微量力価プレートのウエル当り100 μLのハイブリッド形成混合物を加えた。37°Cにて捕捉用オリゴと標的オリゴを30分間ハイブリッド形成させた。次いで、0. 1%ツイーン20の入った300 μLの1×SSC (1×SSCは150mMのNaCl、15mMのクエン酸ナトリウム) にてウエルを5回洗浄した。最後に、0. 1%ツイーン20入りの1×SSC中の0. 12 μMの検出用プローブ (EQ-3246、SEQ ID NO8) を100 μL、37°Cにて30分間加え、次いで0. 1%ツイーン20入りの1×SSCにて3回洗浄した。

#### 【0136】

ビオチン化した検出用プローブにストレプトアビジンー西洋ワサビペルオキシダーゼ (streA-HRP) を結合することによりハイブリッドを検出した。0. 1%ツイーン20入りの1×SSCに1 μg/mLの濃度でstreA-HRP (米国、イリノイ州、ロックフォード、ピアース、カタログ番号21126) を溶解した。ウエル当り100 μL加え、15分間インキュベートした。次いで1×SSC；0. 1%ツイーン20でプレートを3回洗浄し、OPDアッセイにてシグナルを発色させた。

#### 【0137】

OPDアッセイ

6 mLの0. 1 Mクエン酸緩衝液、pH=5. 0、2 mgのオルソーフェニレンジアミン(OPD)の錠剤を2錠(デンマーク、コペンハーゲン、ケムーエン-テック)及び2. 5 μLの30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含有する主要混合物を調製した。100 μLの主要混合物を各反応槽に加え、酵素活性に応じて1~30分間インキュベートする。100 μLの0. 5 MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>によってアッセイを停止し、ELISA読み取り装置によりλ=492 nmにて光学密度を測定する。

結果を図5に示す。

### 【0138】

#### 結論

ハイブリッド形成のシグナルは、約0. 2 Mでその効果を開始し、約1 M~2 Mで最適条件を有するGnSCN濃度の関数として高められることが観察される。

GnSCNによる最も顕著な増強はリン酸を基にした緩衝液におけるC8捕捉用LNAプローブとWT標的オリゴの間のハイブリッド形成で見られた。GnSCNの最適濃度では、シグナルは75%増強された。

T8とMUTオリゴとのハイブリッド形成はGnSCNによってさほど影響を受けなかった。リン酸緩衝液では、GnSCNの高い濃度(4 M)は否定的な効果を有した。

### 【0139】

結論的には、クエン酸ナトリウムに基づいた緩衝液、例えば多数の細胞溶解緩衝液に用いられている種類のものは、リン酸に基づいた緩衝液と少なくとも同じくらい良好であり、塩酸グアニジン(GnHCl)のようなGnSCNは、高い濃度でさえハイブリッド形成を行うことができ、それを増強することが判る。

### 【0140】

#### (実施例 4)

クエン酸ナトリウム緩衝液とリン酸緩衝液を比べて、GnSCNにおけるハイブリッド形成は特異的である(競合実験)

クエン酸ナトリウム又はリン酸を基にした、グアニジンチオシアネート(GnSCN)を含有する緩衝液におけるハイブリッド形成の厳密性を比較するために

以下の実験を行った。

5' アントラキノンを持つLNA改変オリゴ（表2を参照のこと）をUV照射によって微量力価プレートのウエルに共有結合で固相化し、相補的な標的DNAオリゴとのハイブリッド形成アッセイにおいて捕捉用プローブとして用いた。ハイブリッド形成混合物において5' ビオチン化DNA検出用プローブを包含することによってハイブリッドを検出した。

### 【0141】

【表4】

オリゴヌクレオチドの実験

名称	EQ番号	配列番号	配列	特徴
C8	EQ-3133	4	5'-AQ-tac atg tta tgc tt GAC <sup>met</sup> C <sup>met</sup> GT GTg-3'	LNA修飾 5' アントラキノン
T8	EQ-3134	9	5'-AQ-tac atg tta tgc tt GAC <sup>met</sup> TGT GTg-3'	LNA修飾 5' アントラキノン
野生型 ターゲット 分子	EQ3185	7	5'ttg aat tcc aag agc aca cgg tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	野生型 sense g/c pos. 9756 (50-mer)
変異型 ターゲット 分子	EQ3187	10	5'ttg aat tcc aag agc aca cag tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	Sense a/t pos. 9756 (50-mer)
検出プローブ	EQ-3246	8	5'-biotin-ttg gaa gtg ccc tgc agc tt-3'	5' ビオチン化DNA

### 【0142】

表4は、調べたオリゴヌクレオチドに関する。

注： LNAモノマーを大文字で示し、DNAモノマーを小文字で示す。C m e tはモノマーが5-メチルシトシンLNAであることを示す。5' -AQは、オリゴが5' アントラキノン及びC3リンカーを持ち、組成物がAQ-C O N H-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-オリゴであることを示す。5' -ビオチンは、オリゴの5' 末端がビオチン-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C O N H-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-オリゴであることを示す。

## 【0143】

## A p o B 捕捉用プローブの固相化

濃度 0. 1  $\mu\text{M}$  の 0. 2 M の NaCl 中にアントラキノン LNA 捕捉用プローブ (C8 又は T8 のいずれか、表4を参照のこと) を溶解した。100  $\mu\text{L}$  のオリゴを微量力価プレート (C96、ポリソープ；デンマーク、ロスキルド、ナルジ・ヌンク・インターナショナル) の各ウエルに加え、最大 35 °C にて ULS-20-2 照射器 (UVライトシステムズ；デンマーク) における軟UV光 (約 350 nm) に 15 分間暴露した。28 個のフィリップス・クレオ小型 25W-S 電球 (ガラスの試料保持板の上に 14 個及び下に 14 個) とともに照射器を配置し、上方の電球のみに明かりをつけた。

## 【0144】

インキュベートの後、300  $\mu\text{L}$  の 0. 25% ツイーン 20 (ドイツ、Seelze Riedel-de Haen) 入りの 0. 4 M の NaOH にてまずウエルを洗浄し、次いで 300  $\mu\text{L}$  の脱イオン水にて 3 回洗浄した。

## 【0145】

野生型標的分子 (EQ-3185) 及び変異型標的分子 (EQ-3187) とのハイブリッド形成

C8 捕捉用プローブ (EQ-3133、SEQ ID NO 4) でコートしたウエルに野生型標的分子 (EQ-3185、SEQ ID NO 7) を低い一定の濃度 (0. 0005  $\mu\text{M}$ ) で加え、一方、競合する单一塩基ミスマッチ変異型標的分子 (EQ-3187、SEQ ID NO 10) の量は 5 倍『連続希釈』で変化させた。変異型標的分子の得られた濃度は、0. 0001、0. 0005、0. 0025、0. 012、0. 06、及び 0. 30  $\mu\text{M}$  であった。

## 【0146】

T8 捕捉用プローブ (EQ-3134、SEQ ID NO 9) をコートしたチャンバーに、変異型標的分子を低い一定の濃度 (0. 005  $\mu\text{M}$ ) で加え、一方、競合する单一塩基ミスマッチ野生型標的分子 (EQ-3185、SEQ ID NO 7) の量は 5 倍『連続希釈』で変化させた。野生型標的分子の得られた

濃度は、0.0001、0.0005、0.0025、0.012、0.06  
、及び0.30 μMであった。

#### 【0147】

0.5%サルコシル入りの40 mMのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 7)又は0.1%ツイーン20入りの50 μMのリン酸緩衝液のどちらかに最終濃度4 Mの固体GnSCNを溶解することによってハイブリッド形成用緩衝液を構築した。0MのGnSCNを含有する同様の緩衝液によって4 MのGnSCNを含有する緩衝液を希釈することによって更に低い濃度のGnSCN緩衝液を構築した。

#### 【0148】

微量力価プレートのウェル当り100 μLのハイブリッド形成混合物を加えた。37°Cにて捕捉用オリゴと標的オリゴを30分間ハイブリッド形成させた。次いで、0.1%ツイーン20の入った300 μLの1×SSC(1×SSCは150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸ナトリウム)にてウェルを5回洗浄した。次いで、0.1%ツイーン20入りの1×SCS中の0.12 μMの検出用プローブ(EQ-3246、SEQ ID NO 8)を100 μL加え、37°Cにて30分間ハイブリッド形成させた。最後に0.1%ツイーン20入りの1×SCSにて微量力価プレートを3回洗浄した。

#### 【0149】

ビオチン化した検出用プローブにストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(streptavidin-HRP)を結合することによりハイブリッドを検出した。0.1%ツイーン20入りの1×SSCに1 μg/mLの濃度でstreptavidin-HRP(米国、イリノイ州、ロックフォード、ピアース、カタログ番号21126)を溶解した。ウェル当り100 μL加え、15分間インキュベートした。次いで1×SSC；0.1%ツイーン20でプレートを3回洗浄し、OPDアッセイにてシグナルを発色させた。

#### 【0150】

OPDアッセイ

6 mLの0.1 Mクエン酸緩衝液、pH=5.0、2 mgのオルソーフェニレ

ンジアミン(O P D)の錠剤を2錠(デンマーク、コペンハーゲン、ケムーエンテック)及び $2.5 \mu\text{L}$ の30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含有する主要混合物を調製した。 $100 \mu\text{L}$ の主要混合物を各反応槽に加え、酵素活性に応じて1~30分間インキュベートする。 $100 \mu\text{L}$ の0.5MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>によってアッセイを停止し、ELISA読み取り装置により $\lambda = 492 \text{ nm}$ にて光学密度を測定する。

結果を図6~9に示す。

### 【0151】

#### 結論

この実験に基づいて、高濃度のGnSCNにおいてさえ、ハイブリッド形成の厳密性は、GnSCNを含まない緩衝液で認められる厳密性と同等であると結論付けられる。更に、厳密性は、クエン酸ナトリウムを基にした緩衝液とリン酸を基にした緩衝液とで同等であると結論付けられる。

### 【0152】

C8捕捉用プローブと共に、競合する変異型標的分子の濃度が0.05μMを超えるまで(非特異的)シグナルにおける明瞭な上昇は見られない。この濃度ではマッチしたオリゴとミスマッチのオリゴの比は1:100である。4MのGnSCN、リン酸緩衝液におけるC8とのハイブリッド形成を除いて、マッチしたオリゴとミスマッチのオリゴの同等の寄与(例えば、シグナルにおける2倍増加)は、競合オリゴのいかなる量においても得られない。4MのGnSCN、リン酸緩衝液におけるC8とのハイブリッド形成の場合、同等のシグナルが約0.15μMで得られるということはシグナルとノイズの比が約300であることを示している。残りのハイブリッド形成では、シグナルとノイズの比は1:600を超えていている。

### 【0153】

T8捕捉用プローブと共に、競合する野生型標的分子の濃度が0.1μMを超えるまで(非特異的)シグナルにおける明瞭な上昇は見られない。この濃度ではマッチしたオリゴとミスマッチのオリゴの比は1:20である。マッチしたオリゴとミスマッチのオリゴの同等の寄与(例えば、シグナルにおける2倍増加)は、競合オリゴのいかなる量においても得られない。従って、同等のシグナルは

、1:60よりも高いマッチしたオリゴとミスマッチのオリゴの比で得られると思われる。言い換えれば、1:60よりも高いシグナルとノイズの比が認められる。

#### 【0154】

クエン酸ナトリウムを基にした緩衝液又はリン酸を基にした緩衝液においてハイブリッド形成の厳密性はほとんど同じである。しかしながら、クエン酸ナトリウムを基にした緩衝液の方が高いハイブリッド形成シグナルが得られた。

#### 【0155】

グアニジンチオシアネート (GnSCN) のような強力なカオトロピック剤を含有する緩衝液におけるハイブリッド形成は、単一塩基の差異を検出できるよう十分に高い厳密性で行うことができ、クエン酸ナトリウム又はリン酸のいずれかに基づいた緩衝液を使用すると結論付けられる。

#### 【0156】

##### (実施例 5)

塩酸グアニジンを含有する緩衝液におけるDNA及びLNAオリゴヌクレオチドの熱安定性

温度調節されたペルティエ素子 (パーキンエルマー、UVラムダ40) を装備した分光光度計を用いて、すべてがDNAのオリゴヌクレオチド及びLNAで改変したオリゴヌクレオチドの熱安定性を分光測定により測定した。2つの異なる緩衝液 (50mMのNaPO<sub>4</sub>、pH 6.8、0.1mMのEDTA中の4MのGnHC1又は50mMのNaPO<sub>4</sub>、pH 6.8、115mMのNaCl、0.1mMのEDTA) のいずれか、及び等モル量 (1μM) のLNA改変オリゴヌクレオチド及びその相補的又はミスマッチオDNAリゴヌクレオチドを含有する1mLのハイブリッド形成用混合物を調製した。対照として改変されていないオリゴヌクレオチドを用いた同じハイブリッド形成用混合物を調製した。

#### 【0157】

加熱ブロックにおいてエッペンドルフ管にて各試料を90℃まで加熱し、スイッチを切った加熱ブロックの中で室温まで緩やかに冷却した。試料を500μLの石英キュベット (パーキンエルマー) に移した。次いで、UVラムダ40分光

光度計にて試料を測定した。1分間当たり1°C温度を上げながら260nmにて試料を測定した。融解曲線の最初の微分係数としてT<sub>m</sub>を得た。表6に結果を要約する。表5には用いたオリゴを要約する。

## 【0158】

【表5】

## オリゴヌクレオチドの実験

名称	EQ番号 ber	配列番号	配列	特徴
112T	EQ-3485	11	5'-C <sup>met</sup> GC <sup>met</sup> AC <sup>met</sup> A C <sup>met</sup> GT-3'	LNA
as112t	EQ-3493	12	5'-acg tgt gcg-3'	LNA
as112c	EQ-3495	13	5'-acg tgc gcg-3'	all-DNA
158T	EQ-3489	14	5'-GGC <sup>met</sup> AC <sup>met</sup> T TC <sup>met</sup> -3'	LNA
as158t	EQ-3497	15	5'-aga agt gcc-3'	LNA
as158c	EQ-3499	16	5'-aga agc gcc-3'	all-DNA

## 【0159】

【表6】

オリゴ対		パッファー含有ハイブリダイゼーションにおけるT <sub>m</sub>	
	マッチング	165 mM Na <sup>+</sup>	4 M G <sub>n</sub> HCl
LNA (EQ3485) : DNA (EQ3493)	完全マッチ	73.8°C	65.4°C
LNA (EQ3485) : DNA (EQ3495)	1つミスマッチ	51.5°C (ΔT <sub>m</sub> 22.3°C)	41.1°C (ΔT <sub>m</sub> 24.3°C)
LNA (EQ3489) : DNA (EQ3497)	完全マッチ	69.9°C	61.2°C
LNA (EQ3489) : DNA (EQ3499)	1つミスマッチ	47.0°C (ΔT <sub>m</sub> 22.9°C)	33.2°C (ΔT <sub>m</sub> 28.0°C)

## 【0160】

表5は、調べたオリゴヌクレオチドに関する。

注： LNAモノマーを大文字で示し、 DNAモノマーを小文字で示す。 Cme  
tはモノマーが5-メチルシトシンLNAであることを示す。

### 【0161】

#### 結果

表6は、塩酸グアニジンを含有する緩衝液におけるDNAオリゴヌクレオチドと  
LNAオリゴヌクレオチドの熱安定性を示す。

注： $\Delta T_m$  は完全に一致するLNA : DNAのヘテロ二重らせんと当該二重らせ  
んとの間の $T_m$  の差異を示す。

### 【0162】

#### 結論

実験から、強力なカオトロピック剤を高濃度で含有する緩衝液においてハイブ  
リッド形成は起きると結論付けられる。

標的のDNAオリゴヌクレオチドに单一のミスマッチを導入すると、LNA :  
DNAヘテロ二重らせんの $T_m$  は有意に低下する。結果は、 $T_m$  の変化は標準緩  
衝液に比べてグアニジン含有緩衝液の方が明瞭であることを示し、強力なカオト  
ロピック剤を含有するハイブリッド形成用緩衝液がハイブリッド形成による單一  
塩基の区別に有利である可能性を示唆している。

### 【0163】

#### (実施例 6)

LNA捕捉用オリゴへのPCR産物のハイブリッド形成による單一塩基多型の  
検出

複合生物試料において特異的な配列を検出することが可能かどうかを試す第1  
段階として以下の実験を行った。

PCR産物は、合成された50個オリゴの鑄型を加えることよりもかなり複雑  
であり、このことがハイブリッド形成工程を問題にしている可能性がある。カオ  
トロピックな緩衝液中でのハイブリッド形成が十分に識別力があり、感度が高い  
かどうかを調べるために、野生型又は変異型ApoB3500のいずれかを含有  
する種々の鑄型によってPCR反応を行い、LNAハイブリッド形成アッセイで

調べた。アッセイは、捕捉用プローブとして作用する、5'アントラキノンで固相化されたLNA改変オリゴ（表7を参照）及び相補的な標的DNAオリゴとしてのPCR産物から成っていた。PCR産物のビオチン化された末端にストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼを結合し、その後OPD反応を行うことによってハイブリッドを検出した。

### 【0164】

【表7】

#### オリゴヌクレオチドの実験

名称	E Q番号	配列番号	配 列	特 徴
C8	EQ-3133	4	5'-AQ-tac atg tta tgc tt GAC <sup>met</sup> C <sup>met</sup> GT GTg-3'	LNA修飾 5'アントラキノン
T8	EQ-3134	9	5'-AQ-tac atg tta tgc tt GAC <sup>met</sup> TGT GTg-3'	LNA修飾 5'アントラキノン
前進 プライマー	EQ3198	17	5'-biotin-cta gtg agg cca aca ctt-act tga att cca aga gc-3'	5'ビオチン化DNA プライマー, sense(35- mer)
後退 プライマー	EQ3213	3	5'-gtt ttt cgt act gtg ctc cca gag-3'	DNA プライマー, sense (24-mer)

### 【0165】

表7は、適用されたオリゴヌクレオチドに関する。

注： LNAモノマーを大文字で示し、DNAモノマーを小文字で示す。C m e tはモノマーが5-メチルシトシンLNAであることを示す。5' AQは、オリゴが5'アントラキノン及びC3リンカーを持ち、組成物がAQ-C O N H- (CH2)3-オリゴであることを示す。5' -ビオチンは、オリゴの5'末端がビオチン- (CH2)4-C O N H- (CH2)6-オリゴであることを示す。

### 【0166】

【表8】

## PCRテンプレート

試 料	資 源	Characteristics
HCV29	ヒトDNA	ApoB35000, 野生型 sense g/c pos. 9756
T112C1	ヒトDNA	ApoB35000, 野生型 sense g/c pos. 9756
T112D1	ヒトDNA	ApoB35000, 野生型 sense g/c pos. 9756
"A-allele"-プラスミド	プラスミド	ApoB35000, 変異型 type, sense a/t pos. 9756

## 【0167】

表8は、PCRの錆型に関する。

注：このような総DNA及びプラスミドに適用された前向き及び逆向きプライマーと共に、予想されるPCR增幅断片は長さ167塩基対であり、センス鎖上で5'ビオチン化される。

## 【0168】

プライマーの合成及び分析

市販（デンマーク、Aarhus、DNAテクノロジー）に由来するHPLC精製オリゴとしてDNAプライマーを得た。

## 【0169】

試料の調製

## 1) ヒトのゲノムDNA

3種の異なるヒトの癌細胞株：HCV29、T112C1、T112D1（Skoulios et al., Mol. Carcin., 2:59~62, 1989）から通常のフェノール抽出（Sambrook et al., Molecular Cloning, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）によってヒトのゲノムDNAを単離し、それらはApob3500の多型（Ludwig et al., DNA, 6:363~372, 1987, 受入番号M19828）に関して野生型である。

## 2) 『A-対立遺伝子』プラスミド

哺乳類の血液に対するDNA単離キット（デンマーク、Hvidovre、ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ、ロシュ・モレキュラー・システムズカタログ番号1667327）を用い、製造元の勧めに従って5mlの全血からヒトのゲノムDNAを単離した。

Apob3500遺伝子座を含む野生型のヒトApob遺伝子の一部をPCR増幅することによってApob遺伝子の『A一対立遺伝子』を作製した。TOP O（登録商標）TAクローニング（登録商標）キット（米国、カリフォルニア州、カールスバッド、インビトロゲン・コーポレーションのインビトロゲン、カタログ番号K4500-01）を用いて、pCR'（登録商標）2.1-TOP OプラスミドにPCR断片をクローニングした。キアゲン（登録商標）プラスミドキット（ドイツ、ヒルデン、キアゲン社）を用いて細菌の培養からプラスミドDNAを精製した。ALFエクスプレスII DNA分析システム（アマシャム・ファルマシア・バイオテック）を用いて、製造元の勧めに従って、DNAの配列決定を行うことにより挿入部のDNA配列を確認した。

### 【0170】

#### 試料調製におけるPCR

##### 6つの反応のためのPCR主要混合物

148. 50μLのH2O

30μLの10x Amplicaqゴールド緩衝液（米国、コネチカット州、ノーウォーク、パーキンエルマー・コーポレーション）

18μLのMgCl<sub>2</sub> (2.5mM)

30μLのdNTP (2mM)

30μLの前向きプライマー、EQ3198 (SEQ ID NO17) (10 μM)

30μLの後向きプライマー、EQ3213 (SEQ ID NO3) (10 μM)

1. 5μLのAmplicaqゴールド（登録商標）DNAポリメラーゼ (5U / μL) (米国、コネチカット州、ノーウォーク、パーキンエルマー・コーポレーション、パーキンエルマー、カタログ番号N808-0240)

## PCR増幅

エッペンドルフのマスター サイクラー 勾配熱サイクラー（ドイツ、ハンブルグ、エッペンドルフ - Netheler-Hinz-GmbH）を用いて 0.5 mL の薄壁チューブにおいて PCR 反応を行った。

48 μL の主要混合物に 2 μL の試料を加えた。

## 熱サイクリング

変性：94°C、15分

増幅（30サイクル）：94°Cにて40秒、56°Cにて40秒、72°Cにて40秒

伸展：72°C、10分

停止：4°C、∞

## 【0171】

## 検出

続いて、ゲルにおいて 1:30,000 に希釈されたゲルスター<sup>R</sup>（米国、メイン州、ロックランド、FMCバイオプロダクツ）及び 1 x トリス酢酸 / EDTA 電気泳動緩衝液（0.04 M のトリス酢酸；0.001 M の EDTA）を含む 2% アガロースゲル（米国、マジソン、プロメガ・コーポレーション、LE 分析用等級）における通常のゲル電気泳動によって PCR 産物を分析した。5 μL の各 PCR 反応物に 1 μL の 6 X 泳動緩衝液（40% スクロース、0.25% プロモフェノールブルー、0.25% キシレンシアノール、0.1 M EDTA、pH 8.0）を加えた。7 V/cm の定電圧にて約 1 時間ゲルを泳動した。

永久記録するために、適当な UV 透過照射器（米国、カリフォルニア州、アップランド、TM-20E 型 UV プロダクツ）及びフィルター（米国、ニューヨーク州、ロチェスター、イーストマン・コダック社、コダックワラテン #9）を用いて、通常のポラロイド（英国、セントアルバンス、ポラロイド社）撮影にてゲルを写真撮影した。

## 【0172】

## A p o B 捕捉用プローブの固相化

濃度 0.1 μM の 0.2 M の NaCl 中にアントラキノン LNA 捕捉用プローブ

ブ (C 8又はT 8のいずれか、表7を参照のこと) を溶解した。100 μLのオリゴを微量力値プレート (C 96、ポリソープ；デンマーク、ロスキルド、ナルジ・ヌンク・インターナショナル) の各ウエルに加え、最大35°CにてULS-20-2照射器 (UVライトシステムズ；デンマーク) における軟UV光 (約350 nm) に15分間暴露した。28個のフィリップス・クレオ小型25W-S電球 (ガラスの試料保持板の上に14個及び下に14個) とともに照射器を配置し、上方の電球のみに明かりをつけた。

#### 【0173】

インキュベートの後、300 μLの0.25%ツイーン20 (ドイツ、Seelze Riedel-de Haen) 入りの0.4MのNaOHにてまずウエルを洗浄し、次いで300 μLの脱イオン水にて3回洗浄した。

#### 【0174】

##### PCR反応物とのハイブリッド形成

C 8又はT 8捕捉用プローブを固相化したチャンバーに、95 μLの2M G n S C N クエン酸ナトリウム緩衝液と共に、5 μLのPCR反応物を加え、37°Cにて30分間インキュベートした。

ハイブリッド形成用緩衝液は、0.5%のサルコシルを含む40mMのクエン酸ナトリウム緩衝液pH7中の2MのG n S C Nであった。

ハイブリッド形成の後、0.1%ツイーン20の入った300 μLの1xSSC (1xSSCは150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸ナトリウム) にてウエルを5回洗浄した。

#### 【0175】

ビオチン化したPCR産物にストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ (streA-HRP) を結合することによりハイブリッドを検出した。0.1%ツイーン20入りの1xSSCに1 μg/mLの濃度でstreA-HRP (米国、イリノイ州、ロックフォード、ピアース、カタログ番号21126) を溶解した。ウエル当たり100 μL加え、15分間インキュベートした。次いで1xSSC; 0.1%ツイーン20でプレートを3回洗浄し、OPDアッセイにてシ

グナルを発色させた。

### 【0176】

#### OPDアッセイ

6 mLの0.1Mクエン酸緩衝液、pH=5.0、2 mgのオルソーフェニレンジアミン(OPD)の錠剤を2錠(デンマーク、コペンハーゲン、ケムーエン-テック)及び2.5 μLの30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含有する主要混合物を調製した。100 μLの主要混合物を各反応槽に加え、酵素活性に応じて1~30分間インキュベートする。100 μLの0.5MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>によってアッセイを停止し、ELISA読み取り装置によりλ=492 nmにて光学密度を測定する。

結果を図10に示す。

### 【0177】

#### 結論

4つのPCR反応物すべてにおいて、2MのGnSCNにおけるハイブリッド形成によって单一塩基の差異を検出することが可能である。前の実施例で見られるように、『A対立遺伝子』の捕捉プローブ(T8)に対するシグナルは、C8 DNA捕捉プローブで得られるシグナルよりも低く、更にシグナルがこの場合、極めて明瞭であるということは、2MのGnSCNにおけるハイブリッド形成は厳密性が高いことを示している。

### 【0178】

#### (実施例 7)

##### 細菌の細胞溶解物におけるプラスミドDNAの検出

本発明のハイブリッド形成法及び抽出法を核酸及び非核酸の複雑な生物混合物に適用してもよいかどうかを調べるために以下の実験を行った。

簡単に言えば、2つはプラスミドを含有し、1つはプラスミドを含まない(表7-1を参照のこと)3つの異なる細菌(E. coli K12)株を培養し、溶解し、グアニジンチオシアネート(GnSCN)含有の緩衝液におけるハイブリッド形成によってプラスミドを検出した。

### 【0179】

#### 【表9】

## バクテリア株

菌株の名称	ゲノム型	文献
NF1815	MC1000 recA1	Casadaban (1980) J.Mol.Biol.138, 179-207.
TOP10/pCR	F <sup>r</sup> mcrA (mr-hsdRMS-mcrBC) _80 lacZ M15 lac_74 recA1 deoR araD139 (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG pCR®2.1-TOPO	Invitrogen, cat. no. K4500-01, Invitrogen Corporation, Carlsbad CA USA
TOP10/pApobwt	F <sup>r</sup> mcrA (mr-hsdRMS-mcrBC) _80 lacZ M15 lac_74 recA1 deoR araD139 (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG pApobwt	

## 【0180】

表9は、細菌株に関する。

## 【0181】

## A p o B w t プラスミドのクローニング

A p o B 3 5 0 0 遺伝子座を含む野生型のヒト A p o B 遺伝子の一部を P C R 増幅することによって A p o B 遺伝子の『G 一対立遺伝子』を作製した (Ludwig et al., DNA 6:363~372, 1987; 受入番号M19828、S E Q I D N O 1 及び S E Q I D N O 2)。T O P O (登録商標) T A クローニング (登録商標) キット (米国、カリフォルニア州、カールスバッド、インビトロゲン・コーポレーションのインビトロゲン、カタログ番号K4500-01) を用いて、p C R (登録商標) 2. 1-T O P O プラスミドに P C R 断片をクローニングした。キアゲン (登録商標) プラスミドキット (ドイツ、ヒルデン、キアゲン社) を用いて細菌の培養からプラスミド D N A を精製した。A L F エクスプレス I I D N A 分析システム (アマシャム・ファルマシア・バイオテック) を用いて、製造元の勧めに従って、D N A の配列決定を行うことにより挿入部の D N A 配列を確認した。得られたプラスミドを p A p o B w t と命名した。

TOP10/pCR株は、いかなるApoB挿入部も含まないpCR（登録商標）2.1-TOPOプラスミドを含有する。

### 【0182】

#### 細菌の細胞溶解物の調製

振盪装置上で37°Cにて一晩、100μg/mLのアンピシリンと共にLB培地 (Sambrook et al., Molecular Cloning, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) 中で細菌を増殖させた。

翌日、細胞を遠心し(8000回転/分で15分間)、1/50容量の50mMトリス-C1(pH8.0)に再浮遊した。次いで、氷上で45秒間、細胞を超音波破碎した、又は、2.5mLの再浮遊細胞につき100mg/mLのリゾチーム0.250mLを加え、室温にて15分間インキュベートした。次いで溶解した細胞を、-20°Cに保持した。

### 【0183】

#### 検出

UV照射によって5'アントラキノンを持つLNA改変オリゴ(表10を参照)を微量力価プレートのウエルに共有結合で固相化し、相補的な標的DNAオリゴとのハイブリッド形成アッセイにおいて捕捉用プローブとして使用した。ハイブリッド形成後の混合物における5'ビオチン化DNA検出用プローブを包含することによってハイブリッドを検出した。

### 【0184】

#### 【表10】

## オリゴヌクレオチドの実験

名称	E Q番号	配列番号	配列	特 徴
C11	EQ-3131	5	5'-AQ-tac atg tta tgc tt AAG AC <sup>met</sup> <u>C</u> <sup>met</sup> GTG TGC-3'	L N A修飾 5' アントラキノン
T11	EQ-3132	18	5'-AQ-tac atg tta tgc tt AAG AC <sup>met</sup> <u>I</u> GTG TGC- 3'	L N A修飾 5' アントラキノン
検出プローブ	EQ-3246	8	5'-biotin-ttg gaa gtg ccc tgc agc tt-3'	5' ビオチン化D N A

## 【0185】

表10は、調べたオリゴヌクレオチドに関する。

注： L N Aモノマーを大文字で示し、 D N Aモノマーを小文字で示す。 C m e t はモノマーが5-メチルシトシンL N Aであることを示す。 5' A Q は、オリゴが5' アントラキノン及びC 3リンカーを持ち、組成物がA Q-C O N H-(C H 2) 3-オリゴであることを示す。 5' -ビオチンは、オリゴの5' 末端がビオチン-(C H 2) 4-C O N H-(C H 2) 6-オリゴであることを示す。

## 【0186】

## A p o B捕捉用プローブの固相化

濃度0. 1 μ Mの0. 2MのN a C 1中にアントラキノンL N A捕捉用プローブ(C 11、T 11、表7-1を参照のこと)を溶解した。 100 μ Lのオリゴを微量力価プレート(C 96、ポリソープ；デンマーク、ロスキルド、ナルジ・ヌンケ・インターナショナル)の各ウエルに加え、最大35°CにてU L S-20-2照射器(U Vライトインシステムズ；デンマーク)における軟U V光(約350 nm)に15分間暴露した。 28個のフィリップス・クレオ小型25W-S電球(ガラスの試料保持板の上に14個及び下に14個)とともに照射器を配置し、上方の電球のみに明かりをつけた。

インキュベートの後、300 μ Lの0. 25%ツイーン20(ドイツ、Seelze

Riedel-de Haen) 入りの 0. 4 M の NaOH にてまずウエルを洗浄し、次いで 300 μL の脱イオン水にて 3 回洗浄した。

### 【0187】

#### ハイブリッド形成

50 μL の細胞溶解物と 50 μL (4 M の GnSCN、25 mM のクエン酸ナトリウム、pH 7、0.5% のサルコシル) を混合し、C8 又は T8 LNA 捕捉用プローブをコートした微量力価プレートのウエルに加えた。37 °C にて混合物を一晩インキュベートした。

次いで、0.1% ツイーン 20 の入った 300 μL の 1xSSC (1xSSC は 150 mM の NaCl、15 mM のクエン酸ナトリウム) にてウエルを 5 回洗浄した。次いで 0.1% ツイーン 20 の入った 1xSSC に溶解した 100 μL の 0.12 μM の検出用プローブ (EQ-3246、SEQ ID NO 8) を加え、37 °C にて一晩ハイブリッド形成させ、次いで 0.1% ツイーン 20 の入った 1xSSC にて微量力価プレートを 3 回洗浄した。

ビオチン化した検出用プローブにストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ (strepA-HRP) を結合することによりハイブリッドを検出した。0.1% ツイーン 20 入りの 1xSSC に 1 μg/mL の濃度で strepA-HRP (米国、イリノイ州、ロックフォード、ピアース、カタログ番号 21126) を溶解した。ウエル当り 100 μL 加え、15 分間インキュベートした。次いで 1xSSC；0.1% ツイーン 20 でプレートを 3 回洗浄し、OPD アッセイにてシグナルを発色させた。

### 【0188】

#### OPD アッセイ

6 mL の 0.1 M クエン酸緩衝液、pH = 5.0、2 mg のオルソーフェニレンジアミン (OPD) の錠剤を 2 錠 (デンマーク、コペンハーゲン、ケムーエン-テック) 及び 2.5 μL の 30% H2O2 を含有する主要混合物を調製した。100 μL の主要混合物を各反応槽に加え、酵素活性に応じて 1 ~ 30 分間インキュベートする。100 μL の 0.5 M の H2SO4 によってアッセイを停止し

、E L I S A 読み取り装置により  $\lambda = 492 \text{ nm}$  にて光学密度を測定する。

結果は、図 11 に示す。

### 【0189】

#### 結論

結果から、超音波破碎によって溶解した細菌においてもリゾチーム処理によつて溶解した細菌においても p A p o B w t プラスミドを捕捉することができ、検出することができると結論付けられる。プラスミドは 2 本鎖高次コイルDNA分子なので、本実験は、細菌の粗溶解物のような複合生物試料において 2 本鎖高次コイルDNA分子を検出することが可能であることを示している。

### 【0190】

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Exiqon

<120> ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND  
DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES

<130> 22642PC1

<160> 18

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 1  
cttacttgaa ttccaagagc acacggtctt cagtgaagct gcagggcact 50

<210> 2  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 2  
cttacttgaa ttccaagagc acacagtctt cagtgaagct gcagggcact 50

<210> 3  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic primer

<400> 3  
gttttcgta ctgtgctccc agag 24

<210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic primer

<221> modified\_base  
<222> (16)...(23)  
<223> LNA

<221> modified\_base  
<222> (18)...(19)  
<223> 5-methyl-cytosine LNA

<400> 4

```

tacatgttat gctttgaccg ttgtg
<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> SyArtificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<221> modified_base
<222> (16)...(26)
<223> LNA

<221> modified_base
<222> (20)...(21)
<223> 5-methyl-cytosine LNA

<400> 5
tacatgttat gctttaagac cgtgtgc
<210> 6
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic primer

<221> modified_base
<222> (1)...(9)
<223> LNA

<221> modified_base
<222> (1)...(1)
<223> 5'-hexaethylenglycol LNA

<221> modified_base
<222> (4)...(4)
<223> 5-methyl-cytosine LNA

<400> 6
agaccgtgt
<210> 7
<211> 50
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<400> 7
ttgaattcca agagcacacg gtcttcagtg aagctgcagg gcacttccaa
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

```

24

27

9

50

<pre> &lt;400&gt; 8 ttgaaagtgc cctgcagctt  &lt;210&gt; 9 &lt;211&gt; 24 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence  &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic primer  &lt;221&gt; modified_base &lt;222&gt; {16}...{23} &lt;223&gt; LNA  &lt;221&gt; modified_base &lt;222&gt; {18}...{18} &lt;223&gt; 5-methyl-cytosine LNA </pre>	20
<pre> &lt;400&gt; 9 tacatgttat gctttgactg tgtg  &lt;210&gt; 10 &lt;211&gt; 50 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Homo Sapiens  &lt;400&gt; 10 ttgaattcca agagcacaca gtcttcagtg aagctgcagg gcacttccaa </pre>	24
<pre> &lt;210&gt; 11 &lt;211&gt; 9 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence  &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic primer  &lt;221&gt; modified_base &lt;222&gt; {1}...{8} &lt;223&gt; LNA  &lt;221&gt; modified_base &lt;222&gt; {1}...{1} &lt;223&gt; 5-methyl-cytosine LNA  &lt;221&gt; modified_base &lt;222&gt; {3}...{3} &lt;223&gt; 5-methyl-cytosine LNA  &lt;221&gt; modified_base &lt;222&gt; {5}...{5} &lt;223&gt; 5-methyl-cytosine LNA  &lt;221&gt; modified_base &lt;222&gt; {7}...{7} &lt;223&gt; 5-methyl-cytosine LNA </pre>	50

```

<400> 11
cgcacacgt                                9

<210> 12
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 12
acgtgtgcg                                9

<210> 13
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 13
acgtgcgcg                                9

<210> 14
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<221> modified_base
<222> (1)...(8)
<223> LNA

<221> modified_base
<222> (3)...(3)
<223> 5-methyl-cytosine LNA

<221> modified_base
<222> (5)...(5)
<223> 5-methyl-cytosine LNA

<221> modified_base
<222> (8)...(8)
<223> 5-methyl-cytosine LNA

<400> 14
ggcacttct                                9

<210> 15
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic primer

```

```

<400> 15
agaagtgcc                                     9

<210> 16
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 16
agaagcgcc                                     9

<210> 17
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 17
ctatgtgaggc caaacacttac ttgaattcca agagc      35

<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<221> modified_base
<222> (16)...(26)
<223> LNA

<221> modified_base
<222> (20)...(20)
<223> 5-methyl-cytosine LNA

<400> 18
tacatgttat gctttaagac tgtgtgc                  27

```

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

本発明の1つの実施態様を説明する。1) 試料を共有結合で付着させたオリゴ捕捉LNA、溶解緩衝液、検出プローブ(LNA)等と共にピペットでチューブ又はウェルに注入し、2) 溶解細胞、解離プロテイン及び核酸が溶液中で遊離され、LNAの高濃度T<sub>m</sub>により、核酸が捕捉LNAオリゴにより捕らえられて検出LNAとハイブリッド化され、3) インキュベート、洗浄及び混入が行われ混合物へと生成され、さらに試験結果を読みとる。

#### 【図2】

微量力値プレートのウェルに共有結合で固相化された3種の異なったLNA改変オリゴ(表1を参照のこと)と相補的な標的オリゴで行ったハイブリッド形成

実験。示されるように、様々な濃度の塩酸グアニジン (GnHC1) でハイブリッド形成を行った。

### 【図3】

様々な濃度の塩酸グアニジンで行ったLNAハイブリッド形成の特異性を実証する競合アッセイ。マッチした野生型オリゴの量は0.5nMの濃度で一定に保つ一方で、競合するもの（一塩基ミスマッチの変異型オリゴ）の濃度は0.1nM～0.3μMで変化させた。矢印は標的オリゴと競合オリゴが等モルであることを示す。更に0～8Mの塩酸グアニジン (GnHC1) を含有するハイブリッド形成用緩衝液で得られたハイブリッド形成能も示す。

### 【図4】

様々な濃度の塩酸グアニジンで行ったLNAハイブリッド形成の特異性を実証する競合アッセイ。マッチした変異型オリゴの量は5nMの濃度で一定に保つ一方で、競合するもの（一塩基ミスマッチの野生型オリゴ）の濃度は0.1nM～0.3μMで変化させた。矢印は標的オリゴと競合オリゴが等モルであることを示す。更に0～8Mの塩酸グアニジン (GnHC1) を含有するハイブリッド形成用緩衝液で得られたハイブリッド形成能も示す。

### 【図5】

微量力価プレートのウエルに共有結合で固相化された2種の異なったLNA改変オリゴ（表3-1を参照のこと）と2種の相補的な標的DNAオリゴで行ったLNAハイブリッド形成実験。示されるように、様々な濃度のグアニジンチオシアネート (GnSCN) 及びクエン酸ナトリウム又はリン酸のどちらかを基にした緩衝液でハイブリッド形成を行った。

### 【図6】

リン酸を基にした緩衝液及び様々なグアニジンチオシアネート (GnSCN) で行ったハイブリッド形成の特異性を実証する競合アッセイ。マッチした野生型オリゴの量は0.5nMの濃度で一定に保つ一方で、競合するもの（一塩基ミスマッチの変異型オリゴ）の濃度は0.1nM～0.3μMで変化させた。矢印は標的オリゴと競合オリゴが等モルであることを示す。更に0～4MのGnSCNを含有するハイブリッド形成用緩衝液で得られたハイブリッド形成能も示す。

## 【図7】

リン酸を基にした緩衝液及び様々なグアニジンチオシアネート (GnSCN) で行ったハイブリッド形成の特異性を実証する競合アッセイ。マッチした変異型オリゴの量は 5 nM の濃度で一定に保つ一方で、競合するもの（一塩基ミスマッチの野生型オリゴ）の濃度は 0. 1 nM～0. 3 μM で変化させた。矢印は標的オリゴと競合オリゴが等モルであることを示す。更に 0～4 M の GnSCN を含有するハイブリッド形成用緩衝液で得られたハイブリッド形成能も示す。

## 【図8】

クエン酸ナトリウムを基にした緩衝液及び様々なグアニジンチオシアネート (GnSCN) で行ったハイブリッド形成の特異性を実証する競合アッセイ。マッチした野生型オリゴの量は 0. 5 nM の濃度で一定に保つ一方で、競合するもの（一塩基ミスマッチの変異型オリゴ）の濃度は 0. 1 nM～0. 3 μM で変化させた。矢印は標的オリゴと競合オリゴが等モルであることを示す。更に 0～4 M の GnSCN を含有するハイブリッド形成用緩衝液で得られたハイブリッド形成能も示す。

## 【図9】

クエン酸ナトリウムを基にした緩衝液及び様々なグアニジンチオシアネート (GnSCN) で行ったハイブリッド形成の特異性を実証する競合アッセイ。マッチした変異型オリゴの量は 5 nM の濃度で一定に保つ一方で、競合するもの（一塩基ミスマッチの野生型オリゴ）の濃度は 0. 1 nM～0. 3 μM で変化させた。矢印は標的オリゴと競合オリゴが等モルであることを示す。更に 0～4 M の GnSCN を含有するハイブリッド形成用緩衝液で得られたハイブリッド形成能も示す。

## 【図10】

單一ヌクレオチド多型の検出。 3 種のヒト細胞株 (HCV29、T112C 1 及び T112D1) に由来するビオチン化した PCR 増幅物及びプラスミドを作成した。Apob3500 変異に関して 3 種のヒト細胞株はすべて野生型 (G 一対立遺伝子) である。『A 一対立遺伝子』プラスミドは、Apob3500 Q (アミノ酸 3500において G→A の塩基転位、[アルギニン→グルタミン])

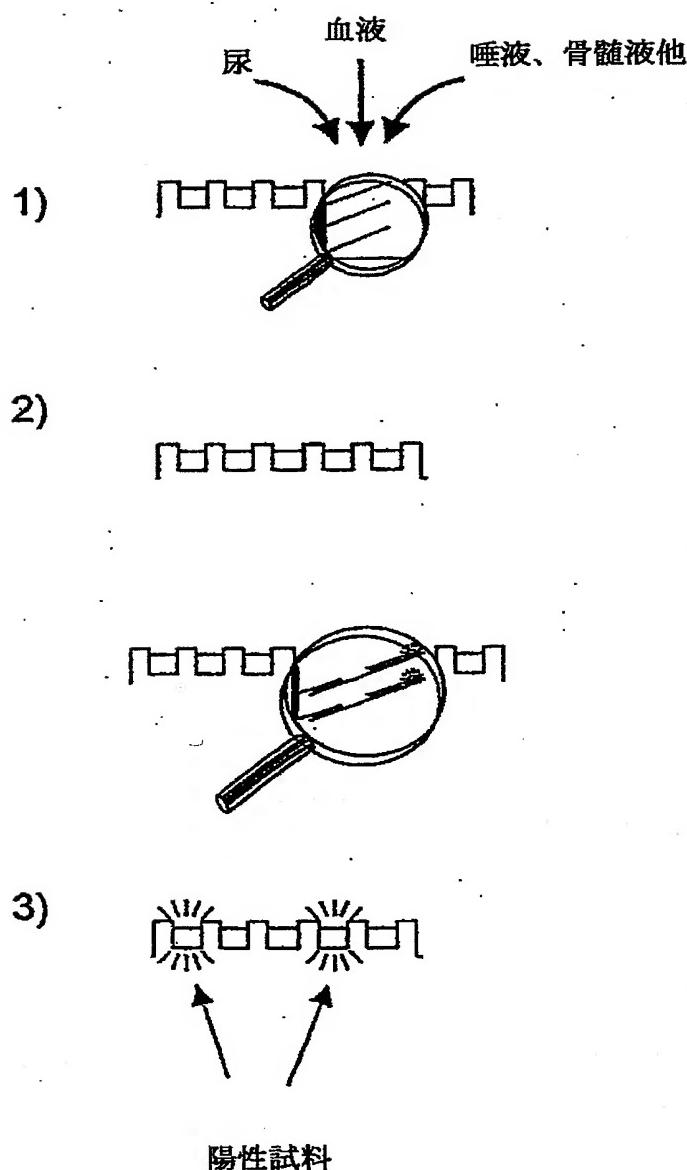
) 変異を含有する。野生型 (C 8) 又は変異型 (T 8) に特異的な L N A 捕捉用プローブに対して各試料を調べた。黒棒：野生型、明るい棒：変異型

【図 1 1】

細菌の細胞溶解物におけるプラスミド D N A の検出。3種の細菌株（表7-1を参照のこと）を溶解して、微量力価プレートのウエルに共有結合で固相化されたC 1 1 又はT 1 1 のどちらかの捕捉用プローブ（表7-2を参照のこと）とハイブリッド形成させた。2 Mのグアニジンチオシアネートを含有するハイブリッド形成用緩衝液においてハイブリッド形成を行った。N F 7 8 1 5 細胞は、プラスミドを含有せず、T O P 1 0 / p C R はA p o B配列を含まずに p C R<sup>R</sup> 2. 1 - T O P O プラスミドを含有し、T O P 1 0 / p A p o B w t は、p C R<sup>R</sup> 2. 1 - T O P O プラスミドに挿入されたA p o B 3 5 0 0 野生型配列を含有する。

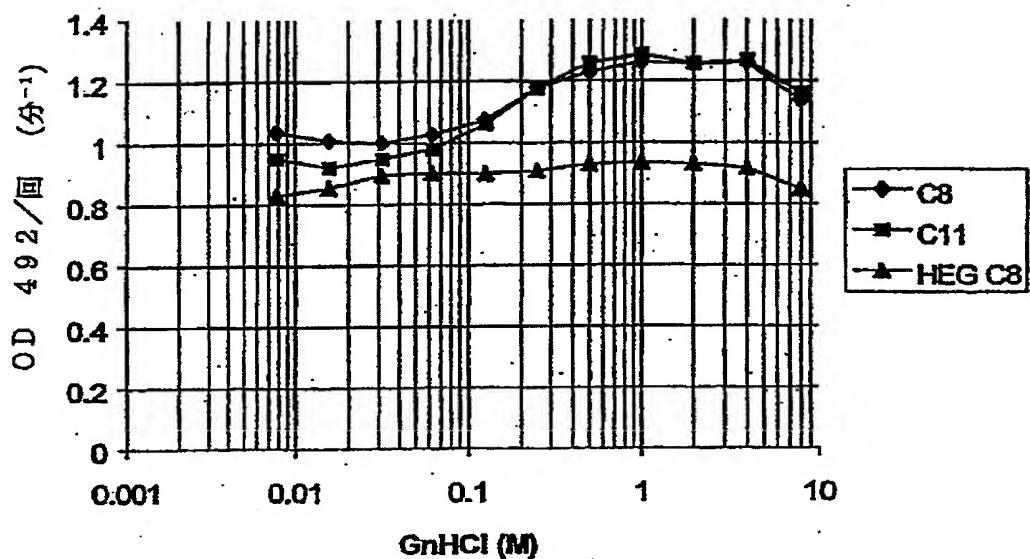
【図1】

## 原則の説明

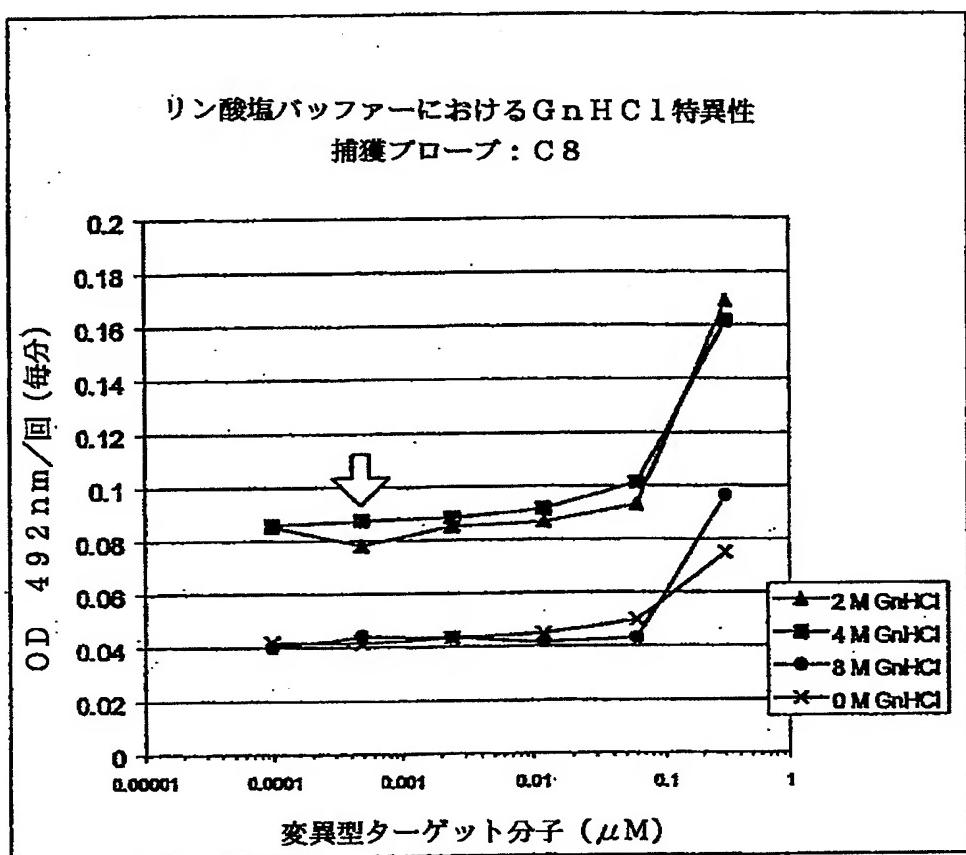


【図2】

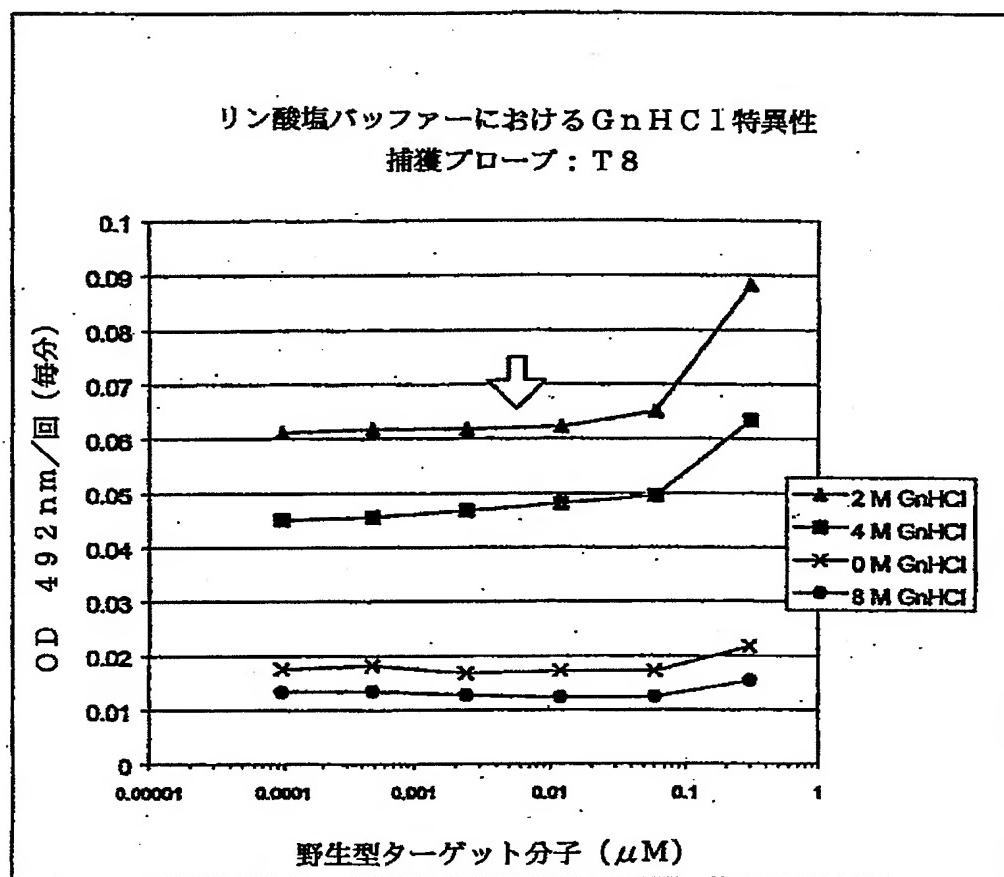
## GnHClにおけるハイブリダイゼーション



【図3】

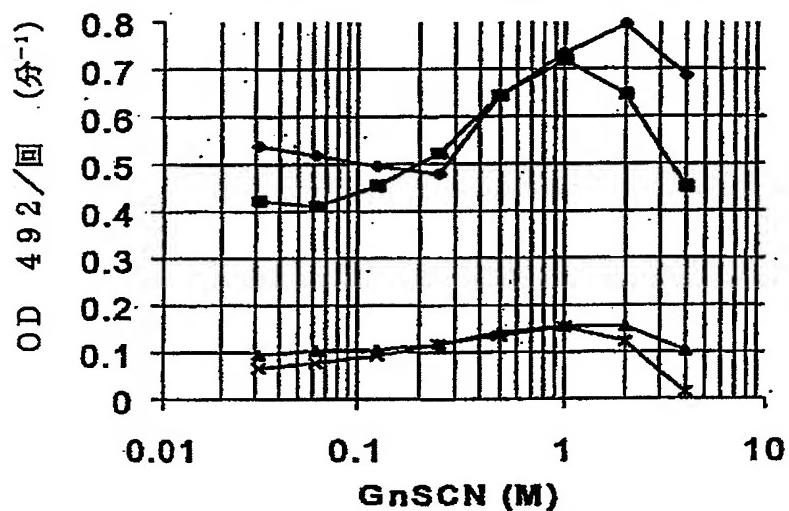


【図4】



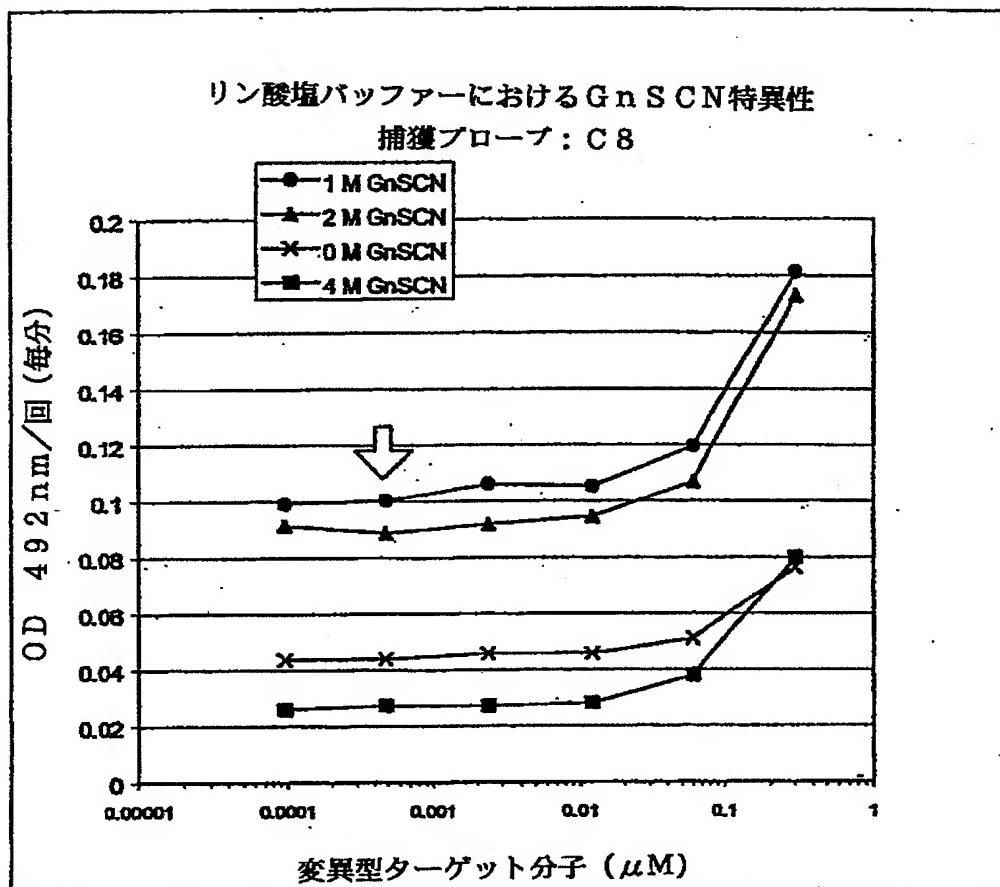
【図5】

リン酸塩バッファー及びクエン酸ナトリウムバッファー

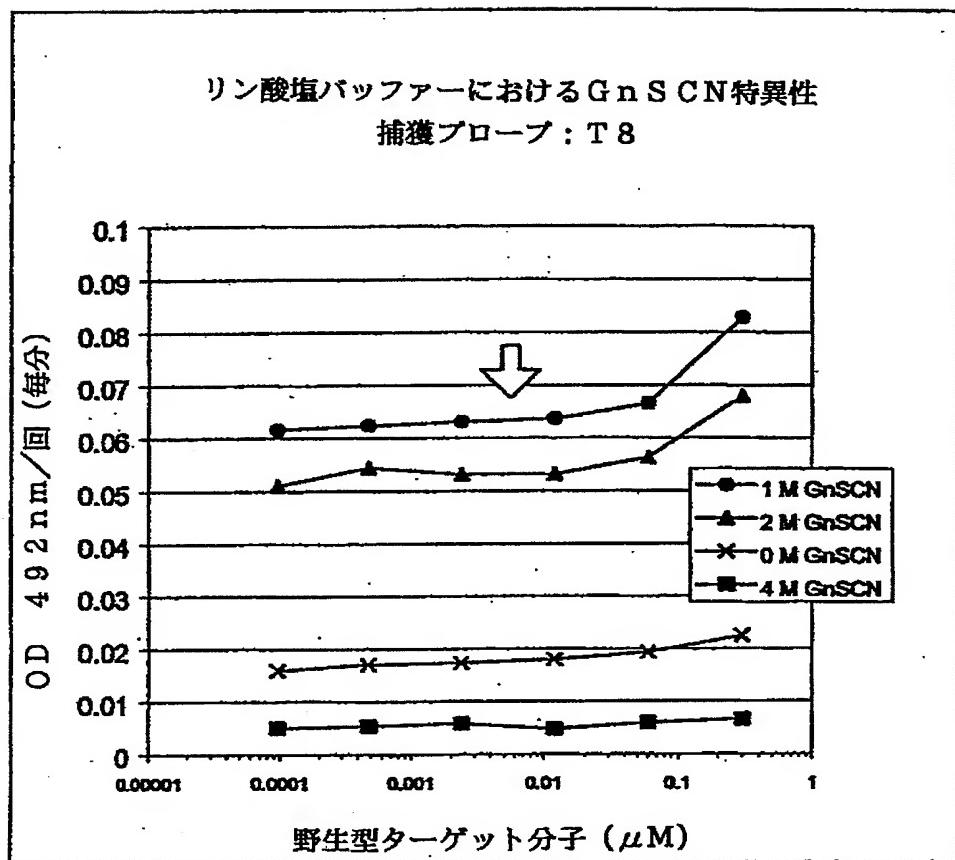


- |                   |
|-------------------|
| —●— クエン酸塩、C8及びWT  |
| —■— リン酸塩、C8及びWT   |
| —▲— クエン酸塩、T8及びMUT |
| —×— リン酸塩、T8及びMUT  |

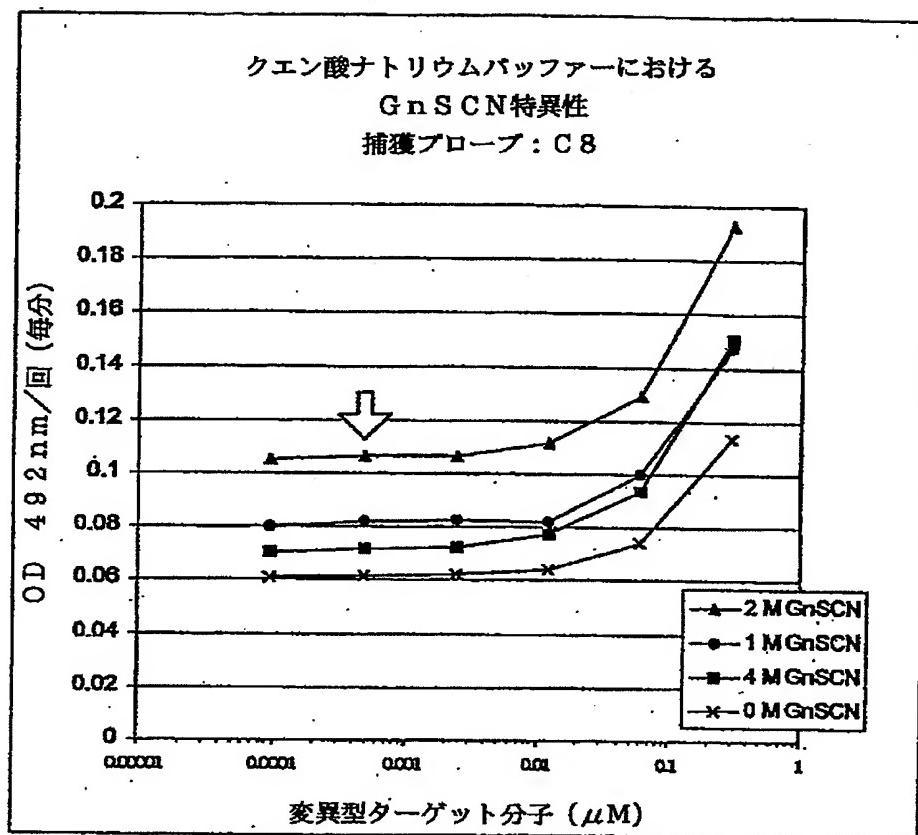
【図6】



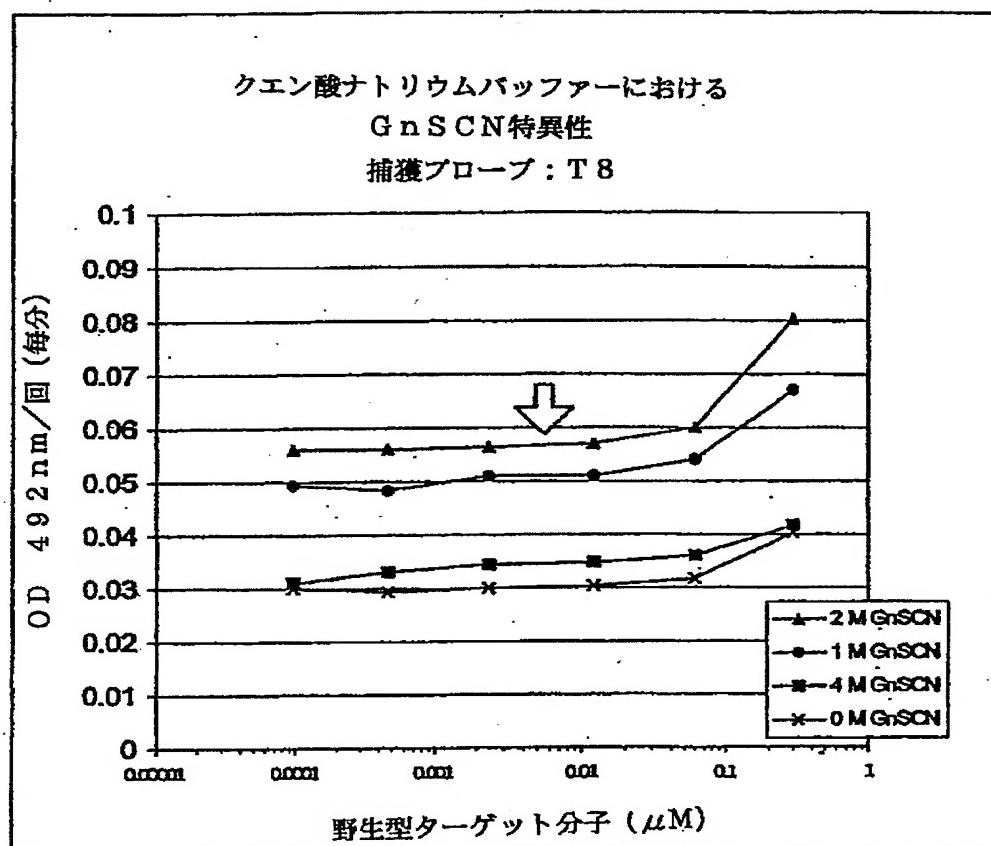
【図7】



【図8】

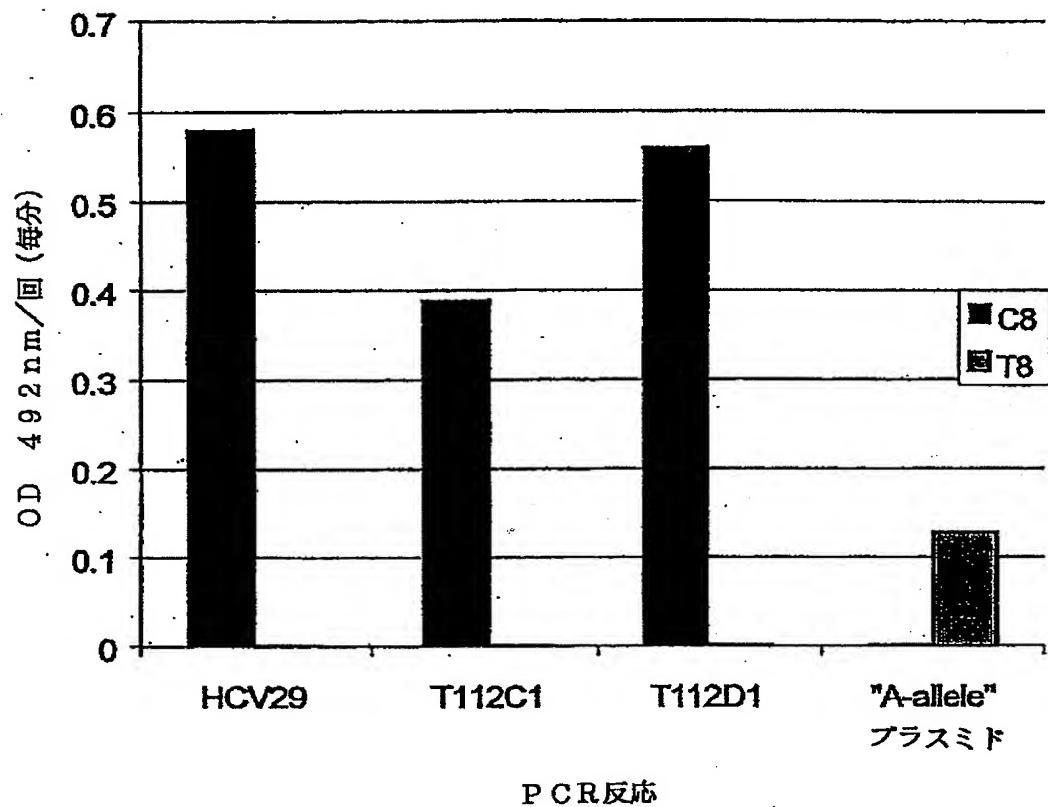


【図9】



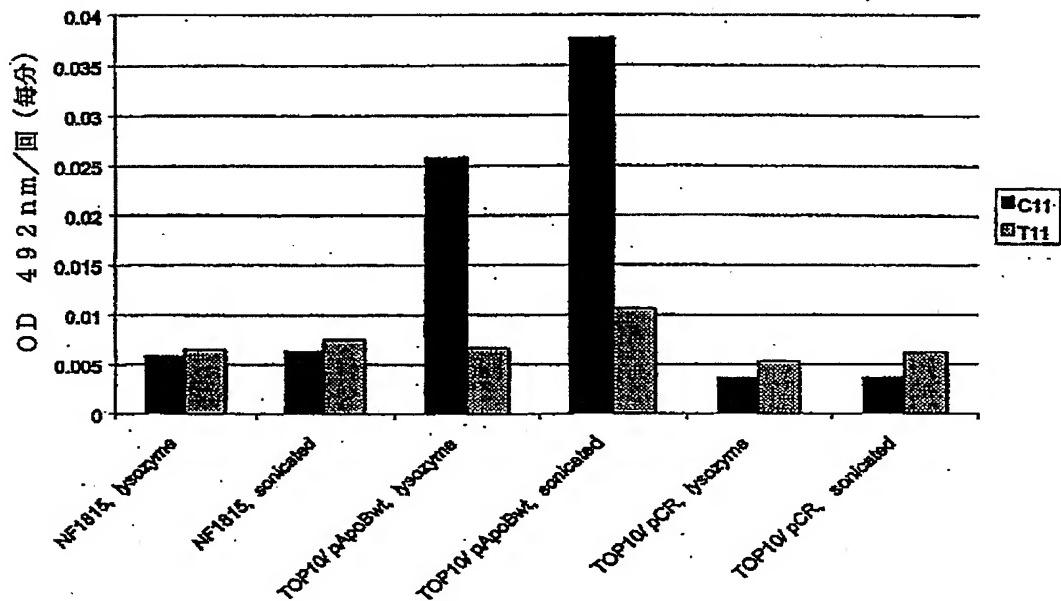
【図10】

## 一塩基変異多型の検出



【図11】

## プラスミドの検出



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/UK 00/00128
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C07K19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S K SINGH ET AL: "LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis and High-Affinity Nucleic Acid Recognition" CHEMICAL COMMUNICATIONS, GB, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, no. 4, 21 February 1998 (1998-02-21), pages 455-456, XP002094303 ISSN: 1359-7345 page 456, column 2, line 32 - line 38 ---	1-49
X	SINGH S K ET AL: "Synthesis of 2'-Amino-LNA: A Novel Conformationally Restricted High-Affinity Oligonucleotide Analogue with a Handle" J. ORG. CHEM., vol. 63, 1998, pages 10035-10039, XP002901079 page 10035, column 1, line 1 - line 18 ---	1-49
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  20 June 2000	Date of mailing of the international search report  28 AUG 2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentkantoor 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016	Authorized officer  P. Andersson/Eö	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/UK 00/00128
---

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 20703 A (BUCHARDT OLE) 26 November 1992 (1992-11-26) claims 8-26 ----	1-49
A	US 5 821 060 A (ARLINGHAUS HEINRICH F ET AL) 13 October 1998 (1998-10-13) the whole document -----	1-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			International application No. PCT/DK 00/00128
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9220703 A1	26/11/92	AT 155483 T AU 666480 B AU 1880692 A AU 1884392 A BR 9206049 A CA 2109320 A CA 2109805 A DE 69220946 D,T DK 586618 T EP 0586474 A EP 0586618 A,B ES 2107552 T FI 935208 A GR 3025018 T HU 66597 A HU 9303023 D JP 2758988 B JP 6506945 T JP 6509063 T KR 133131 B NO 934122 A NO 934235 A US 5714331 A US 5736336 A US 5766855 A US 5786461 A US 5977296 A WO 9220702 A	15/08/97 15/02/96 30/12/92 30/12/92 27/12/94 25/11/92 26/11/92 15/01/98 09/02/98 16/03/94 16/03/94 01/12/97 23/11/93 30/01/98 28/12/94 00/00/00 28/05/98 04/08/94 13/10/94 14/04/98 11/01/94 20/01/94 03/02/98 07/04/98 16/06/98 28/07/98 02/11/99 26/11/92
US 5821060 A	13/10/98	NONE	

---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I  
T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ  
, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K  
E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW  
, EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, C  
N, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE  
, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, K  
P, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU  
, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, S  
G, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ  
, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW